



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**NOVAS ESTRATÉGIAS NO COMBATE À TUBERCULOSE: A
NADH-MENAQUINONA DESIDROGENASE DO TIPO II DE
*Mycobacterium tuberculosis***

CARLOS FILIPE SERAFIM SERRA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

DEZEMBRO 2013



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**NOVAS ESTRATÉGIAS NO COMBATE À TUBERCULOSE: A
NADH-MENAQUINONA DESIDROGENASE DO TIPO II DE
*Mycobacterium tuberculosis***

CARLOS FILIPE SERAFIM SERRA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Co-orientador: Professor Doutor Carlos A. Salgueiro

Laboratórios onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

**Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e
Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa**

**Laboratório Requisite-CQFB, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e
Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa**

DEZEMBRO 2013

A presente Dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, por opção do autor.

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram objecto da seguinte comunicação em co-autoria sob a forma de Poster:

Serra, C., A. P. Fernandes, D. Machado, M. Viveiros, C. A. Salgueiro and I. Couto.
The role of type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2) on *Mycobacterium tuberculosis* resistance to drugs, abstr. PS3:232. Congresso Nacional de Microbiologia (MicroBiotec), Aveiro (Portugal), 6 - 8 Dezembro 2013.



O trabalho experimental desta Dissertação foi realizado no âmbito do projecto de investigação científica intitulado "NADH-menaquinona desidrogenase do tipo II (NDH-2) e a cadeia respiratória de *Mycobacterium tuberculosis*: novos alvos terapêuticos no combate à tuberculose", com referência PTDC/BIA-MIC/121859/2010", financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Couto por ter tornado possível a realização deste projecto. Pelo apoio, orientação e conhecimentos partilhados ao longo deste ano, um muito obrigado.

Ao Professor Doutor Carlos Salgueiro, pela ajuda indispensável ao longo do trabalho experimental desenvolvido. Um obrigado pelos conhecimentos e apoio dados ao longo deste ano.

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros, pelas sugestões e pelo enorme conhecimento sobre tuberculose, muito importantes para o desenvolvimento desta tese.

À Professora Doutora Isabel Portugal da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela cedência da estirpe de *Escherichia coli* JOV MM140:pMind.

Ao Professor Doutor Ricardo Parreira, pela ajuda na realização dos protocolos de clonagem importantes para os passos iniciais deste trabalho.

À Diana Machado por todo o apoio dado no laboratório e conhecimentos sobre micobactérias transmitidos ao longo deste ano, muito importantes para a realização do trabalho experimental desta tese.

À Ana Fernandes pela cooperação durante este projecto, nomeadamente nos processos de extracção e caracterização da proteína NDH-2, realizados na FCT.

Ao Filipe, Leonor e Joana, pela ajuda na realização do protocolo de géis SDS-PAGE, trabalho experimental também realizado na FCT.

Ao João Perdigão, pela ajuda na realização do trabalho relativo à estirpe de *M. smegmatis*, indispensável na parte experimental deste projecto.

Aos meus colegas de laboratório, Jorge, Ana, Vânia e Elisabete, obrigado pela companhia ao longo deste ano. Um especial agradecimento à Sofia por me ter acompanhado na chegada ao laboratório de micobactérias.

Às minhas colegas de mestrado, Ana, Andreia, Carolina e Cláudia, pela paciência, ajuda e companheirismo ao longo destes dois anos, e especialmente durante este último ano.

Aos meus grandes amigos, Catarina, Diogo e Joana, pelo apoio e especial papel que tiveram não só neste mestrado, como têm na minha vida em geral. Obrigado pelos momentos que passamos juntos.

Por fim, o principal e especial obrigado aos meus pais, ao meu irmão Miguel e à Margarida pelo apoio que me dão incondicionalmente, pela força e pela presença nos momentos importantes! Foram essenciais para a minha chegada até aqui.

A todos, um muito obrigado!

Dedico esta tese ao meu irmão.

Resumo

A tuberculose continua a ser um problema de saúde mundial, reclamando milhões de vidas todos os anos. A emergência de estirpes *Mycobacterium tuberculosis* multi- e extensivamente resistentes aos fármacos e a ausência de opções terapêuticas tornam urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O objectivo deste trabalho foi estudar a NADH-menaquinona desidrogenase do tipo II (NDH-2) de *M. tuberculosis*, uma enzima essencial na cadeia respiratória desta bactéria, considerada um alvo preferencial para o desenho de novos antibacilares. Pretende-se em particular compreender a relação entre a actividade de NDH-2 e a energia requerida pelos sistemas de efluxo, recentemente reconhecidos como elementos-chave na fase inicial do desenvolvimento de resistência aos compostos antimicrobianos.

O gene *ndh-2*, que codifica para a enzima NDH-2 de *M. tuberculosis*, foi clonado em *Mycobacterium smegmatis* mc²155 e a estirpe transformada utilizada para sobre-expressar a proteína. As duas estirpes, selvagem e transformada, foram caracterizadas por determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos (isoniazida, rifampicina, etambutol, claritromicina, eritromicina, ofloxacina, canamicina, amicacina, gentamicina, capreomicina, tetraciclina) na presença de compostos conhecidos como inibidores de efluxo (IEs), nomeadamente tioridazina, clorpromazina, verapamil, flupentixol, haloperidol, ortovanadato, arilpiperazinas e carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona. O IE haloperidol, seguido do flupentixol e verapamil, provocaram as maiores reduções de CMIs, principalmente para a claritromicina e eritromicina. Avaliou-se também a capacidade destes IEs para inibir o efluxo de brometo de etídio, tendo o verapamil apresentado o maior efeito inibitório. Por último, avaliou-se o efeito dos IE na actividade enzimática de NDH-2, por determinação da actividade de oxirredução de NADH-menaquinona de suspensões membranares das células com NDH-2 sobre-expressa. Os resultados obtidos mostram que a actividade enzimática de NDH-2 é mais afectada pela presença do flupentixol, haloperidol e verapamil, embora a diferentes molaridades. Os resultados obtidos indicam que NDH-2 é um alvo promissor para o desenvolvimento de novos compostos anti-tuberculose.

Abstract

Tuberculosis remains a global health problem, claiming millions of human lives every year. The emergence of drug resistant TB, particularly the one caused by multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, and the lack of therapeutic options, demand for new therapeutic strategies and targets. The objective of this work was to study the type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2) of *M. tuberculosis*, a key enzyme in the respiratory chain, which has been suggested as target for new anti-tuberculosis drugs. We were particularly interested in understanding the functional correlation between the NDH-2 activity and the energy demand of efflux systems, which have been recently recognized as key elements in the early stages of development of the antimicrobial resistance.

The *ndh-2* gene, coding for *M. tuberculosis* NDH-2 was cloned into *Mycobacterium smegmatis* strain mc²155 and the transformed strain used to overexpress the protein. Both wild-type and transformed strains were characterized by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics (isoniazid, rifampicin, ethambutol, clarithromycin, erythromycin, ofloxacin, kanamycin, amikacin, gentamicin, capreomycin and tetracycline) in the presence of compounds known as efflux inhibitors (EIs), namely thioridazine, chlorpromazine, verapamil, flupentixol, haloperidol, orthovanadate, arylpiperazine and carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone. The efflux inhibitor haloperidol, followed by flupentixol and verapamil, promoted the highest reductions in the MICs of the antibiotics, particularly clarithromycin and erythromycin. We also evaluate the EIs ability to inhibit efflux of EtBr, and verapamil demonstrated the highest inhibitory effect. The effect of EIs on the enzymatic activity of NDH-2 was also evaluated by measurement of the NADH-menaquinone oxidoreductase activity on membrane suspensions obtained from cells overexpressing NDH-2. The results obtained showed that the enzymatic activity of NDH-2 is more affected by flupentixol, haloperidol, and verapamil, although at very distinct molarities. Overall, the results indicate that NDH-2 is a promising target for the development of new anti-tuberculosis compounds.

Índice Geral

Comunicações em congresso	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice Geral.....	vi
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Tuberculose	1
1.1.1 Género <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.2 Características gerais	2
1.1.3 Epidemiologia da doença	3
1.1.4 Tratamento da doença.....	5
1.1.5 Tuberculose resistente aos fármacos	6
1.1.6 Desenvolvimento de novos fármacos	8
1.2 Metabolismo respiratório de <i>M. tuberculosis</i>	8
1.2.1 Cadeia respiratória de <i>M. tuberculosis</i>	8
1.2.2 O papel da enzima NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i>	10
1.2.3 Alvos de fármacos na cadeia respiratória	11
1.3 Micobactérias e os sistemas de efluxo	12
1.3.1 O papel das bombas de efluxo.....	12
1.3.2 Inibidores dos sistemas de efluxo	14
1.4 Objectivos da Dissertação	19
 2. MATERIAL E MÉTODOS	 20
2.1 Material	20
2.1.1 Estirpes bacterianas	20
2.1.2 Outro material biológico	20

2.1.3 Meios de cultura, soluções e enzimas.....	22
2.2 Métodos	25
2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	25
2.2.2 Controlo de contaminação	26
2.2.3 Electroforese em gel de agarose	27
2.2.4 Reacção de amplificação do gene <i>ndh-2</i> por PCR	27
2.2.5 Purificação de produtos de PCR.....	28
2.2.6 Extracção de DNA plasmídico	28
2.2.6.1 Extracção de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	28
2.2.6.2 Extracção de DNA plasmídico de <i>M. smegmatis</i>	29
2.2.7 Reacção de ligação do gene <i>ndh-2</i> ao plasmídeo pMind	30
2.2.8 Transformação de bactérias com DNA plasmídico.....	31
2.2.8.1 Transformação de <i>E. coli</i>	31
2.2.8.2 Electrotransformação de <i>M. smegmatis</i>	32
2.2.9 Determinação de concentrações mínimas inibitórias	34
2.2.9.1 Determinação de CMIs de antibióticos e inibidores de efluxo	34
2.2.9.2 Determinação de CMI de antibióticos na presença de inibidores de efluxo.....	35
2.2.10 Determinação de actividade de efluxo por fluorometria em tempo real	36
2.2.10.1 Ensaio de acumulação de brometo de etídio	36
2.2.10.2 Ensaio de acumulação de brometo de etídio na presença de inibidores de efluxo.....	37
2.2.10.3 Ensaio de efluxo	37
2.2.11 Determinação da actividade enzimática da proteína NDH -2 de <i>M. tuberculosis</i> em suspensões membranares	38
2.2.11.1 Expressão e purificação da proteína NDH-2	38
2.2.11.2 Quantificação da proteína total	41
2.2.11.3 Ensaio enzimático	41
3. RESULTADOS	43
3.1 Clonagem do gene <i>ndh-2</i>	43
3.1.1 Amplificação do gene <i>ndh-2</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	43

3.1.2	Obtenção do plasmídeo pMind.....	44
3.1.3	Transformação do plasmídeo pMind: <i>ndh-2</i>	44
3.1.3.1	Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo pMind: <i>ndh-2</i>	44
3.1.3.2	Electrotransformação de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 com o plasmídeo pMind: <i>ndh-2</i>	45
3.2	Determinação de concentrações mínimas inibitórias para as estirpes <i>M. smegmatis</i> mc²155 e <i>M. smegmatis</i> pMind:<i>ndh-2</i>	46
3.2.1	Determinação de CMI de antibióticos	47
3.2.2	Determinação de CMI de inibidores de efluxo	48
3.2.3	Determinação de CMI de antibióticos na presença de inibidores de efluxo.....	49
3.3	Avaliação da actividade de efluxo em tempo real.....	53
3.3.1	Ensaio de acumulação de brometo de etídio.....	53
3.3.2	Ensaio de acumulação de brometo de etídio com inibidores de efluxo.....	55
3.3.3	Ensaio de efluxo.....	56
3.4	Determinação da actividade da proteína NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> em suspensões membranares	58
3.4.1	Purificação da proteína NDH-2	58
3.4.2	Quantificação de proteína total nas suspensões membranares de <i>M. smegmatis</i> ..	60
3.4.3	Comparação da actividade enzimática da proteína NDH-2 em suspensões membranares de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 e <i>M. smegmatis</i> pMind: <i>ndh-2</i>	61
3.4.4	Estudo do efeito dos inibidores de efluxo na actividade enzimática da proteína NDH-2 em suspensões membranares de <i>M. smegmatis</i> pMind: <i>ndh-2</i>	62
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	64
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Índice de Figuras

Figura 1 –	Mapa-mundo com os rácios de incidência estimada de casos de tuberculose em 2011.....	4
Figura 2 –	Representação esquemática da membrana de <i>M. tuberculosis</i>	9
Figura 3 –	Estrutura química de compostos da classe das fenotiazinas e de outros compostos.....	16
Figura 4 –	Possíveis modos de acção das fenotiazinas contra <i>M. tuberculosis</i>	17
Figura 5 –	Estrutura química de compostos descritos como inibidores de efluxo.....	18
Figura 6 –	Mapa do plasmídeo pMind.....	21
Figura 7 –	Representação esquemática do protocolo de purificação da proteína NDH-2.....	40
Figura 8 –	Representação esquemática da reacção catalisada pela proteína NDH-2.....	41
Figura 9 –	Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene <i>ndh-2</i>	43
Figura 10 –	Electroforese em gel de agarose do produto da extracção plasmídica e da linearização do plasmídeo.....	44
Figura 11 –	Electroforese em gel de agarose dos plasmídeos extraídos das culturas de <i>E. coli</i> transformadas	45
Figura 12 –	Electroforese em gel de agarose dos plasmídeos extraídos da estirpe de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 após electrotransformação.....	46
Figura 13 –	Gráfico do ensaio de acumulação da estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	54
Figura 14 –	Gráfico do ensaio de acumulação da estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh-2</i>	54
Figura 15 –	Gráfico do ensaio de acumulação da estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 na presença de inibidores de efluxo.....	55
Figura 16 –	Gráfico do ensaio de acumulação da estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh-2</i> na presença de inibidores de efluxo.....	56

Figura 17 –	Gráfico do ensaio de efluxo da estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	57
Figura 18 –	Gráfico do ensaio de efluxo da estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh-2</i>	57
Figura 19 –	Sedimentos obtidos após a 1 ^a ultracentrifugação	58
Figura 20 –	Electroforese SDS-PAGE das alíquotas recolhidas ao longo de vários passos de purificação.....	59
Figura 21 –	Curva de calibração utilizada no doseamento da proteína total das suspensões membranares.....	60
Figura 22 –	Curvas normalizadas da variação da absorvância ao longo do tempo.....	61
Figura 23 –	Curvas normalizadas da variação da absorvância ao longo do tempo na presença de diferentes concentrações de inibidores de efluxo.....	62
Figura 24 –	Variação da percentagem de actividade específica da proteína NDH-2 com a concentração dos inibidores de efluxo.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Sequências dos “primers” utilizados.....	21
Tabela 2 – Composição dos meios de cultura.....	22
Tabela 3 – Composição e condições de armazenamento das soluções.....	23
Tabela 4 – Enzimas utilizadas neste trabalho.....	24
Tabela 5 – Antibióticos utilizados e modo de preparação.....	24
Tabela 6 – Inibidores de efluxo utilizados e modo de preparação.....	25
Tabela 7 – Resultados da determinação de CMIs de diferentes antibióticos e brometo de etídio.	47
Tabela 8 – Resultados da determinação de CMIs de diferentes inibidores de efluxo.....	48
Tabela 9 – Resultados da determinação da CMI de antibióticos e brometo de etídio na presença de inibidores de efluxo	49
Tabela 10 – Concentração de proteína total obtida para as suspensões membranares.....	60
Tabela 11 – Actividades específicas da proteína NDH-2 para as suspensões membranares.....	63
Tabela 12 – Percentagem de actividades específicas da proteína NDH-2 na presença de inibidores de efluxo.....	73
Tabela 13 – Quadro resumo dos resultados obtidos	76

Lista de Abreviaturas

ABC – “ATP-binding cassette”

AMK – Amicacina

AS – “Antisense”

ATCC – “American type culture collection”

ATP – “Adenosine triphosphate”

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

BSA – Albumina de soro bovino (do inglês “bovine serum albumin”)

CAP – Capreomicina

CCCP – Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona.

CIP – Ciprofloxacina

CLA – Claritromicina

CLSI – “Clinical and laboratory standards institute” (EUA)

CMI – Concentração mínima inibitória

CPZ – Clorpromazina

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTP – di-nucleótidos

DO – Densidade óptica

DOT – Toma directa observada (do inglês “directly observed therapy”)

EMB – Etambutol

ERY – Eritromicina

EtBr – Brometo de etídio (do inglês “ethidium bromide”)

FMP – Força motriz protónica

FPX – Flupentixol

FW – “Forward”

GET – Gentamicina

GLU – Glucose

HAL – Haloperidol

HEPES – “Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic”

IE – Inibidor de efluxo

INH – Isoniazida

KAN – Canamicina

MATE – “Multidrug and toxic compound extrusion”

MDR – “Multidrug resistance”

MFS – “Major facilitator superfamily”

NADH – “Nicotinamide adenine dinucleotide”

NDH-1 – NADH:desidrogenase tipo I

NDH-2 – NADH:desidrogenase tipo II

NMP – 1-(1-Naftilmetil)piperazina

OADC – Ácido oleico, albumina, dextrose, catalase

OFX – Ofloxacina

ORT – Ortovanadato

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reacção de polimerase em cadeia (do inglês “polymerase chain reaction”)

PMSF – “Phenylmethanesulfonyl fluoride”

RIF – Rifampicina

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês “ribonucleic acid”)

RND – “Resistance nodulation division family”

RV – “Reverse”

S – “Sense”

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (do inglês “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”)

SMR – “Small multidrug resistance”

STR – Estreptomicina

TB – Tuberculose

TB-MR – Tuberculose multirresistente

TB-XR – Tuberculose extensivamente resistente

TET – Tetraciclina

TZ – Tioridazina

U – Unidade de actividade enzimática

UV – Ultravioleta

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

VP – Verapamil

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

1.1.1 Género *Mycobacterium*

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis*, um dos agentes infecciosos com maiores taxas de mortalidade associadas em todo o mundo [65].

O género *Mycobacterium*, composto por mais de 150 espécies de micobactérias, é geralmente dividido em três grupos segundo a sua patogenicidade para o Homem [100]. O primeiro grupo corresponde aos patogéneos estritos, onde se incluem *M. tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*. Ao segundo grupo pertencem as espécies normalmente saprófitas, denominadas de micobactérias oportunistas, onde se inclui por exemplo o complexo *Mycobacterium avium*. Por fim, no terceiro grupo incluem-se as espécies raramente patogénicas como é o caso de *Mycobacterium smegmatis*.

A parede celular das micobactérias é extremamente rica em lípidos, em particular ácidos micólicos de cadeias longas e ramificadas, o que torna estes microrganismos resistentes à descoloração por soluções ácido-alcoólicas [100]. Por esta razão, estas bactérias são designadas por bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) [98]. Os ácidos micólicos estão também presentes mas em menor quantidade noutros géneros bacterianos como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Tsukamurella* e *Gordona*.

M. tuberculosis é um bacilo aeróbio, imóvel e não formador de esporos. Apresenta um conteúdo de guanina e citosina elevado (67%) e um tempo de geração de aproximadamente 24 horas [27, 63]. Por outro lado, *M. smegmatis* apresenta um tempo de geração de 2 a 3 horas, sendo por isso considerada uma micobactéria de crescimento rápido, o que a torna um excelente organismo modelo para estudos dentro do género *Mycobacterium* [96].

1.1.2 Características gerais

Os bacilos causadores de tuberculose podem instalar-se e infectar todos os tecidos e órgãos, incluindo rins, coluna e cérebro (tuberculose extrapulmonar). A infecção pulmonar é, no entanto, a mais frequente forma de infecção provocada por estes bacilos, sendo designada por tuberculose pulmonar.

A transmissão dos bacilos ocorre por via aérea, o que representa um grave problema a nível de controlo da infecção. A transmissão tem origem em doentes com tuberculose pulmonar cavitária, que eliminam bacilos através das secreções broncopulmonares sobretudo durante os esforços de tosse, dando origem a um aerossol de partículas que são, posteriormente, dispersas pelo ar circundante. A inalação das partículas libertadas por terceiros poderá levar à infecção. Quando isso acontece, as bactérias podem ser eliminadas pelo sistema imunitário, nomeadamente pelos macrófagos, podem ser retidas na árvore respiratória superior, ou atingir os alvéolos pulmonares, onde ocorrerá a sua multiplicação.

Os macrófagos são activados e chamados ao local da infecção, e não sendo capazes de eliminar os bacilos, acabam por os fagocitar. No interior das células os bacilos multiplicam-se no lisossoma formado em consequência da fagocitose. Quando lisam, os macrófagos libertam mais bacilos, criando assim um ciclo vicioso, que define o foco primário ou lesão. Nesta fase, há multiplicação activa no interior da lesão. Isto leva à acumulação de material necrótico (*caseum*), formando uma caverna/tubérculo calcificada, onde os bacilos se mantêm em dormência. Este estado de dormência, também designado por estado “infecção latente”, pode durar toda a vida do hospedeiro ou até ocorrer, por exemplo, uma diminuição da imunocompetência o que leva ao aparecimento de manifestações clínicas (estado de “doença”). Durante o estado de infecção latente, os bacilos apresentam baixa actividade metabólica, persistindo por longos períodos sem que ocorra divisão celular, sendo a principal fonte de energia o metabolismo lipídico [94, 126]. Nesta fase, os indivíduos infectados não são capazes de transmitir as bactérias. Contudo, se houver uma reactivação, isto é, se a bactéria se tornar activa no organismo e se começar a multiplicar, ocorrerá uma transição do estado infecção latente para doença. A reactivação ocorre com maior frequência em indivíduos imunodeprimidos, como portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH), diabéticos ou sob terapia anti-

tumoral. Nestas condições, o sistema imunitário é incapaz de evitar o crescimento e multiplicação dos bacilos. Um indivíduo neste estado pode transmitir a bactéria a outras pessoas e assim disseminar a doença [25].

Durante a fase de infecção latente, a maioria dos bacilos encontra-se num estado de baixa actividade metabólica pelo que apresentam uma reduzida sensibilidade aos antibióticos usados como primeira linha de tratamento, uma vez que estes têm como alvo bacilos metabolicamente activos. Neste estado, as bactérias adaptam a sua actividade metabólica, a transcrição celular e a expressão proteica, e entram num estado de persistência não replicativa. Estudos recentes sobre cinética da morte dos bacilos demonstraram que a eficácia dos antibióticos é afectada pelo estado metabólico das bactérias, sendo necessária uma concentração superior de fármaco para eliminar microrganismos em baixa actividade metabólica [101]. A persistência de bacilos com baixa actividade metabólica constitui o principal obstáculo para a eliminação da tuberculose [123]. Para além disso, a grande maioria dos fármacos é incapaz de atingir o seu alvo devido à localização do foco de infecção [11]. A probabilidade de um indivíduo infectado com *M. tuberculosis* desenvolver tuberculose activa é de 10%; já a probabilidade de se instalar um estado de latência é de 90% [112]. Estima-se que em todo o mundo 2 bilhões de pessoas estejam infectadas por *M. tuberculosis* o que representa uma potencial fonte de tuberculose activa [124].

1.1.3 Epidemiologia da doença

A tuberculose é considerada a segunda principal causa de morte por doenças infecciosas, logo após a infecção por VIH [131]. A maioria dos casos activos ocorrem em países em desenvolvimento, onde os recursos para diagnóstico e tratamento são limitados. Por isso, apesar de todos os esforços realizados em programas de controlo de infecção, a tuberculose representa, ainda hoje, um problema de saúde mundial e um grande desafio às autoridades de saúde [3].

Em 2011 estima-se que tenham ocorrido cerca de 8,7 milhões de novos casos de tuberculose (13% co-infecções com VIH) e 1,4 milhões de mortes relacionadas com a doença [131]. Apesar de todos os esforços para a redução dos casos de tuberculose e da mortalidade associada a esta doença, o número de novos casos continua elevado. Na

Figura 1 pode observar-se o mapa da Organização Mundial de Saúde (OMS), onde estão apresentados os valores de novos casos de tuberculose estimados por milhão de habitantes para 2011.

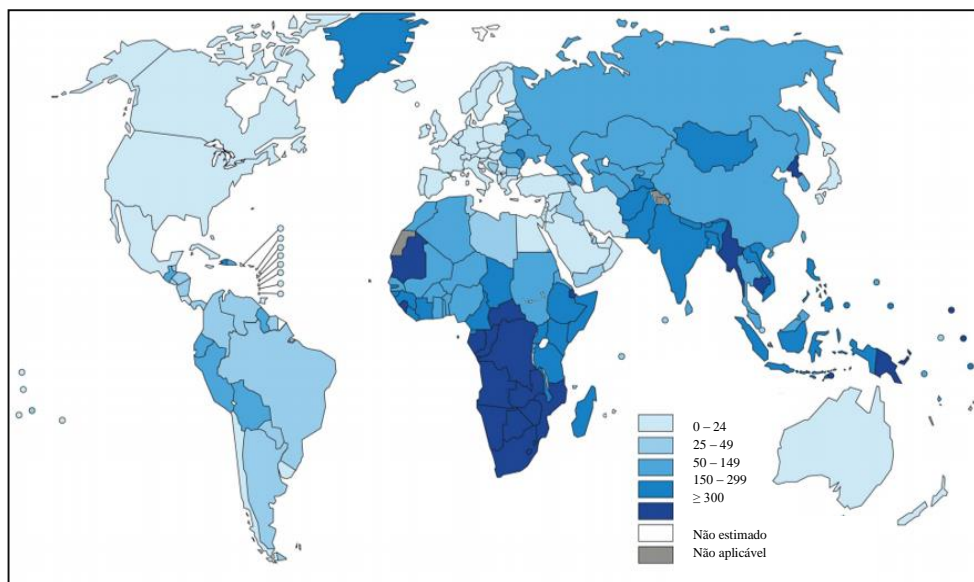


Figura 1 – Mapa-mundo com os rácios de incidência estimada de casos de tuberculose em 2011 por milhão de habitantes [131].

Em termos geográficos, o continente asiático e africano possuem os valores mais elevados de novos casos de tuberculose, sendo que o número de casos da China e Índia representa quase 40% do total de casos no mundo. O continente africano representa cerca de 24% desse valor e possui o maior rácio entre casos e mortes *per capita*. Relativamente a casos de tuberculose causada por estirpes multirresistentes (TB-MR) e extensivamente resistentes (TB-XR), estima-se que estes representem 3,7% do número total de novos casos e 20% do número de casos de retratamento [131].

A nível global, assiste-se a um aumento do número de casos de tuberculose, em particular nas suas formas resistentes aos antibióticos, o que reflecte a existência de deficiências nas estratégias utilizadas no tratamento e no controlo de tuberculose, bem como a limitada eficácia dos sistemas de saúde pública nos diversos países.

Em Portugal verifica-se a maior taxa de novos casos da Europa ocidental, embora as estatísticas oficiais apontem para uma descida gradual e global ao longo dos últimos anos. Em 2010 ocorreram 22 casos por 100 mil habitantes, menos 11% dos casos registados em 2009 [32]. No entanto, apesar do decréscimo do número de casos, Portugal

ainda não se encontra na categoria de país com baixa incidência, e por isso, existe ainda um longo caminho a percorrer [32].

As medidas de controlo de saúde pública aliadas a um diagnóstico correcto e atempado são essenciais para prevenir a disseminação da tuberculose e a emergência de estirpes resistentes. Assim, perante os dados estatísticos, são necessárias mais medidas de controlo e prevenção, bem como um diagnóstico com o menor período de tempo de espera possível, de modo a diminuir o número de casos existentes, e detectar precocemente os casos de resistência aos antibióticos.

1.1.4 Tratamento da doença

A infecção pulmonar por *M. tuberculosis* é inicialmente intracelular, ao nível dos macrófagos alveolares [123]. O tratamento da tuberculose é moroso e exigente e inclui a utilização de diferentes fármacos que actuam ao nível de diferentes alvos da bactéria. No hospedeiro, os bacilos encontram-se em diferentes estados metabólicos e diferentes fases de crescimento, facto que pode contribuir para o tempo prolongado necessário à completa esterilização das lesões tuberculosas nos pulmões [61].

O regime terapêutico mais usado é dividido em duas fases: numa primeira fase são administrados três antibacilares em conjunto, isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) durante dois meses, seguindo-se uma segunda fase de administração de INH e RIF durante quatro meses [130]. Em alguns esquemas terapêuticos é também administrado etambutol (EMB) ou estreptomicina (STR) na fase inicial de tratamento [119].

A isoniazida é um agente bactericida com actividade contra *M. tuberculosis*. Trata-se de um pró-fármaco e como tal, necessita de ser convertido na sua forma activa no interior da célula bacteriana, cabendo esse papel à enzima KatG. Após a activação do fármaco, este irá reagir com NAD, formando um aducto que irá inibir a proteína InhA, envolvida na biossíntese de ácidos micólicos da parede celular e que constitui o alvo celular da isoniazida. A maioria das estirpes clínicas de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida apresentam mutações nos genes *katG* ou *inhA* (zona promotora ou estrutural do gene) [115], podendo também ocorrer resistência de baixo nível por efluxo [54].

A rifampicina tem acção bactericida contra um amplo espectro de microrganismos, entre os quais se incluem micobactérias. Este composto liga-se à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, afectando a transcrição [108]. Em mais de 97% das estirpes resistentes ao composto, estão presentes mutações na região RRDR (“RIF-resistant determining region”) do gene *rpoB*, que cobre 81 pares de bases [76].

O etambutol é um agente efectivo contra o género *Mycobacterium*, tendo como alvo as arabinosiltransferases, envolvidas na transferência de arabinogalactano para a parede celular. A inibição da acção desta enzima provoca uma acumulação de ácidos micólicos, originando a morte celular. Existem diferentes formas desta enzima que se encontram codificados no *locus emb*, encontrado em diversas espécies de micobactérias. No entanto, apesar desta variedade, metade dos casos de resistência parecem ocorrer devido a mutações ao nível do gene *embB* [105].

A pirazinamida também é um pró-farmaco, cuja activação está dependente da enzima pirazinamidase que converte este composto em ácido pirazinóico. A sua acumulação no citoplasma da célula diminui o pH intracelular, inactivando uma enzima envolvida na biossíntese de ácidos gordos. A maioria das estirpes resistentes à PZA possui mutações no gene *pncA* que codifica a enzima pirazinamidase [97].

A estreptomicina é um aminoglicosídeo e foi o primeiro fármaco usado no tratamento da tuberculose. Não tem actividade bactericida mas o seu uso reduz significativamente a carga bacilar, em consequência da inibição da síntese proteica pela ligação ao local A do rRNA 16S na subunidade 30S do ribossoma. A maior percentagem de estirpes resistentes apresenta mutações no gene *rpsL*, que codifica para a proteína ribossomal S12, e no gene *rrs*, que codifica para o rRNA 16S [19].

1.1.5 Tuberculose resistente aos fármacos

A resistência aos antibacilares pode ser primária, quando ocorre infecção com uma estirpe de *M. tuberculosis* resistente, ou adquirida, se o seu aparecimento ocorrer no decurso do tratamento do doente. Uma das causas para a resistência adquirida é o não cumprimento do tratamento prescrito, o que pode levar à selecção de mutantes resistentes [123].

A resistência aos antibióticos deve-se a mecanismos usados pelas bactérias que lhes confere a habilidade de ultrapassar o mecanismo de acção dos fármacos. A estes possíveis mecanismos podem estar associadas mutações em genes que codificam proteínas alvo dos agentes (alteração do alvo do antibiótico), inactivação do antibiótico (ou a sua não activação no caso dos pró-fármacos), e reduzida permeabilidade da parede bacteriana, bem como a actividade de efluxo aumentada. As micobactérias são resistentes à acção da maioria dos antibióticos usados, principalmente devido à reduzida permeabilidade da sua parede celular, o que pode contribuir para a resistência intrínseca do microrganismo (resistência inata). As mutações cromossomais foram, durante muitos anos, a única explicação para a resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis* [123].

As estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes são resistentes pelo menos à isoniazida e à rifampicina, os dois principais antibióticos usados no tratamento da doença. As estirpes de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes são resistentes à isoniazida e à rifampicina, bem como a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos fármacos injectáveis de segunda linha (amicacina (AMK), canamicina (KAN) ou capreomicina (CAP)) [45]. Mais recentemente têm surgido casos de estirpes que são resistentes a todos os fármacos usados no tratamento da tuberculose [110, 113].

Na Europa de leste e na Ásia central o rácio de casos de tuberculose multirresistente é dez vezes superior em relação ao resto do mundo. Na China, um em cada dez doentes com tuberculose estão infectados com estirpes resistentes [128]. Com o aumento do número de casos de TB-XR (5,4% dos casos TB-MR), surge a possibilidade de se voltar à Era pré-antibiótica, ou seja, sem opções terapêuticas [45]. Em Portugal, a emergência de casos de tuberculose multirresistente tem maior frequência na região de Lisboa e Vale do Tejo [32].

1.1.6 Desenvolvimento de novos fármacos

Os primeiros fármacos contra a tuberculose foram descobertos entre 1942 e 1970, e a estreptomicina foi o primeiro fármaco usado no tratamento desta doença. Contudo, durante os 30 anos seguintes não houve desenvolvimento de novos fármacos [37].

Os novos compostos a serem desenvolvidos para o tratamento da tuberculose devem apresentar várias características, nomeadamente terem o potencial de reduzir o tempo de tratamento da doença, uma elevada gama de possíveis alvos celulares, para além de possuírem uma boa biodisponibilidade oral, baixa incidência de efeitos adversos, actividade contra microrganismos resistentes aos antibióticos, baixa interacção com os fármacos usados na terapêutica do VIH e baixo custo [28, 35, 89]. Como referido, o estado de dormência de *M. tuberculosis* é um obstáculo na eliminação dos bacilos, e por isso os novos compostos devem provocar uma redução do número de bacilos neste estado de baixa actividade metabólica [38].

No desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose o metabolismo respiratório encontra-se cada vez mais no âmbito dos estudos como alvo dos novos agentes antimicobacterianos, destacando-se o TMC207 (diarilquinolina) como agente inibidor da produção de ATP [89].

1.2 Metabolismo respiratório de *M. tuberculosis*

1.2.1 Cadeia respiratória de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis é um microrganismo aeróbio, utilizando preferencialmente oxigénio como aceitador final da cadeia transportadora de electrões. Na Figura 2 encontra-se uma representação esquemática do modelo proposto para a cadeia transportadora de electrões de *M. tuberculosis*.

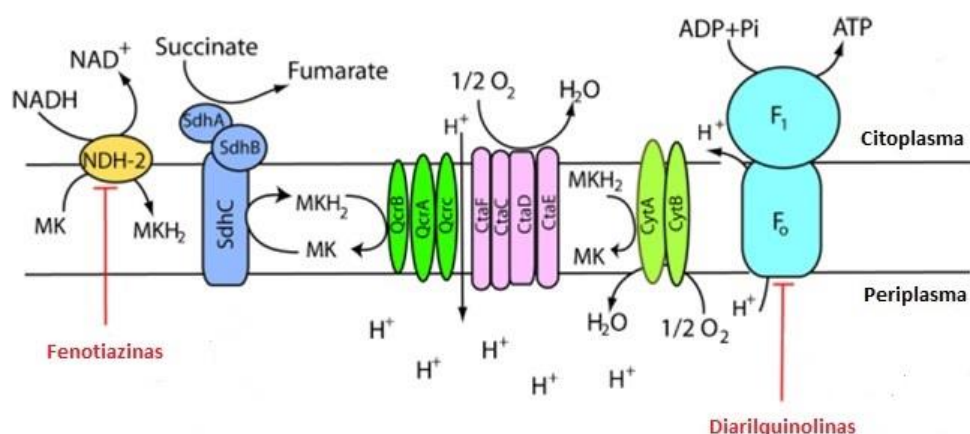


Figura 2 – Representação esquemática da membrana de *M. tuberculosis* e o possível alvo de compostos com actividade antimicobacteriana (adaptado de Bald *et al.* [11]). A menaquinona (MK) pode ser reduzida pela enzima NDH-2 (amarelo) ou via succinato desidrogenase (azul escuro) e oxidada pelo super-complexo citocromo *bc*₁ (verde escuro)/citocromo *aa*₃(rosa) ou pelo citocromo *bd* oxidase (verde claro). A FMP é usada pela ATP sintetase (azul claro) para produção de ATP. As moléculas com actividade antimicobacteriana e a indicação do possível alvo encontram-se a vermelho.

De acordo com este modelo existem dois pontos de entrada de electrões. O primeiro localiza-se ao nível da enzima NADH:desidrogenase do tipo II (NDH-2), a qual catalisa a transferência dos electrões do NADH para a menaquinona (MK). O segundo envolve a enzima succinato desidrogenase (SdhC), a qual é responsável pela oxidação do succinato a fumarato com a concomitante redução de menaquinona. A menaquinona pode ser reoxidada por duas vias alternativas, que envolvem a participação de um citocromo *bc*₁/citocromo *aa*₃ ou de um citocromo oxidase *bd* [22, 127]. Na primeira via, predominante na presença de grandes quantidades de oxigénio, a menaquinona é oxidada pelo complexo citocromo *bc*₁, que transfere electrões para o citocromo *aa*₃. Estes dois complexos enzimáticos formam um super-complexo em micobactérias e estão envolvidos na translocação de protões do citoplasma para o periplasma. Alternativamente, em situação de carência de oxigénio, a menaquinona pode ser directamente oxidada pelo citocromo *bd*, numa reacção que não envolve troca de protões, e por isso energeticamente menos eficiente que a primeira via.

Em micobactérias existem geralmente dois tipos de NADH desidrogenases capazes de oxidar o NADH e fornecer electrões à cadeia de transferência electrónica: a NADH:desidrogenase do tipo I (NDH-1), que também está envolvida na translocação de protões acima referida; e a NADH:desidrogenase do tipo II (NDH-2), que não participa na translocação de protões. No entanto, em *M. tuberculosis*, a enzima NDH-1 (codificada

pelo gene *nuo*) não é essencial [78, 86]. Por outro lado, *M. tuberculosis* possui duas cópias de NDH-2, codificadas pelos genes *ndh* e *ndhA*, das quais a NDH-2 codificada pelo gene *ndh* é essencial para a viabilidade celular [36, 107, 114, 127]. Assim, assume-se que a enzima NDH-2, codificada pelo gene *ndh*, é responsável pela oxidação de NADH em *M. tuberculosis* [11].

1.2.2 O papel da enzima NDH-2 de *M. tuberculosis*

A enzima NDH-2 é uma enzima essencial ao funcionamento da cadeia respiratória de *M. tuberculosis*, constituindo um ponto de entrada de electrões na mesma, como referido anteriormente [107]. Esta enzima é codificada pelo gene *ndh* (Rv1854c), de 1.392 pb, localizado adjacente aos genes *ureABCD*FG que codificam o supercomplexo urease [107]. A NDH-2 tem uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa, é composta por uma cadeia polipeptídica simples, formando uma subunidade única sem centros de ferro-enzofre e não participa na translocação transmembranar de iões. Contém uma flavina como cofactor (FAD) associada não covalentemente à cadeia polipeptídica [23, 44, 64, 87]. Esta proteína encontra-se associada à membrana citoplasmática por um domínio transmembranar em hélice α [23, 36]. A associação da proteína NDH-2 às membranas continua a ser controversa, devido à ausência de domínios transmembranares presentes na maioria das NADH:desidrogenase do tipo II, o que corrobora a observação de que estas enzimas não participam directamente na formação de potencial de membrana [23, 44, 59, 64, 87]. Contudo, sabe-se que estas proteínas se encontram fortemente ligadas às membranas, pois a sua actividade parece aumentar significativamente na presença de lípidos, o que indica a necessidade de um ambiente hidrofóbico para o desempenho da sua actividade [13]. A sequência de aminoácidos destas proteínas contém geralmente um motivo GXGXXG na região N-terminal, importante para a ligação a moléculas dinucleotídicas como a flavina e NADH [13, 59, 107].

Como já referido, a enzima NDH-2 é codificada pelo gene *ndh*, e não tolera alterações na sua sequência, sendo esta uma proteína essencial em micobactérias [36]. *M. tuberculosis* contém duas cópias deste gene, *ndh* e *ndhA*, que partilham 67% de identidade da sequência e cujos produtos são NDH-2 e NDH-2A, respectivamente. Estudos de

mutagénese mostraram que a enzima NDH-2A não é essencial à bactéria [132]. Deste modo, é actualmente proposto que a proteína NDH-2 é a única NADH-desidrogenase funcional na cadeia respiratória de *M. tuberculosis*.

Assim, a enzima NDH-2 é um componente essencial da cadeia respiratória do *M. tuberculosis*, e por isso é considerada como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos [127]. No estado de persistência não replicativa a taxa de transcrição do gene *ndh* encontra-se aumentada, reforçando a importância da enzima NDH-2 nos bacilos neste estado metabólico [107].

1.2.3 Alvos de fármacos na cadeia respiratória

A importância do metabolismo energético para *M. tuberculosis* ficou demonstrado pela primeira vez com a pirazinamida, uma vez que este fármaco tem a capacidade de desregular o pH intracelular que é um importante componente da força motriz protónica (FMP), levando à morte dos bacilos em estado de dormência [38]. Além disso, verificou-se que a concentração intracelular de ATP é significativamente mais baixa (5 a 6 vezes menor) em células de *M. tuberculosis* em estado não replicativo, comparativamente a células em replicação e ambiente aeróbio, o que torna a bactéria sensível a qualquer delecção que ocorra neste componente celular [78]. Existe uma necessidade por parte de *M. tuberculosis* em manter a sua membrana energizada mesmo em ambientes com baixa concentração de oxigénio, o que reflecte a sua incapacidade para sobreviver apenas por fermentação. Assim, a cadeia respiratória é considerada um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos no combate aos bacilos em estado de dormência. Os pontos de vulnerabilidade celular passam por enzimas que iniciam a transferência de electrões na cadeia respiratória, que estão envolvidas na biossíntese de menaquinona, e que mantêm o balanço redox de NAD^+/NADH [38].

Os estudos recentes neste âmbito apontam a enzima NDH-2 como um alvo promissor para o desenvolvimento de compostos, uma vez que está relacionada com o nível energético celular importante no estado de dormência dos bacilos, sendo este um componente essencial à célula. Assim, idealmente, os fármacos usados no tratamento da tuberculose devem ser activos contra estirpes susceptíveis/resistentes, bem como contra bacilos em dormência, e ainda permitir a redução do tempo de tratamento [109].

1.3 Micobactérias e os sistemas de efluxo

1.3.1 O papel das bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas da membrana citoplasmática que reconhecem e expõem da célula diversos compostos, incluindo alguns antibióticos. Podem contribuir para a resistência a diversos compostos, estando já associadas à resistência a antimicrobianos em diferentes bactérias, incluindo micobactérias [6, 66, 67]. Neste contexto, a compreensão destes sistemas é necessária para prevenir o desenvolvimento e aparecimento de eventuais resistências, já que estes sistemas influenciam a concentração do fármaco no interior da bactéria, uma vez que é gerado um balanço entre o efluxo e influxo desses compostos. As bombas de efluxo estão presentes em todos os organismos. Nas bactérias os determinantes destas bombas podem encontrar-se no cromossoma e/ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos. A resistência conferida por estes sistemas está relacionada com um possível aumento da expressão das bombas de efluxo, por mutações em genes reguladores ou substituição de aminoácidos que as tornam mais activas [73]. A multirresistência (MDR, de “multidrug resistance”) surge quando um tipo de bomba de efluxo é capaz de transportar compostos estruturalmente diferentes [73].

Os sistemas de efluxo associados à resistência são classificados em cinco diferentes famílias: “Resistance Nodulation Division family” (RND), “Major Facilitator Superfamily” (MFS), “Small Multidrug Resistance” (SMR), “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE) e “ATP-Binding Cassette” (ABC) [3, 73]. Esta classificação é baseada no número de componentes dos sistemas, no número de regiões transmembranares, na fonte de energia usada e nos tipos de substratos que expõem. As classes MFS, SMR e RND utilizam como fonte energia o gradiente de prótons, a MATE utiliza o gradiente de iões sódio, e a ABC utiliza ATP [73]. É possível que uma única bactéria possa expressar mais que uma destas famílias de bombas de efluxo.

Têm sido descritas bombas de efluxo de diferentes classes em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, as quais parecem estar envolvidas no transporte de diferentes antibióticos, como isoniazida, etambutol, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, fluoroquinolonas [50, 73]. O genoma de *M. tuberculosis* codifica várias bombas de efluxo, onde estão incluídos 26 transportadores ABC e 16 MFS. O gene *lfrA* de *M.*

smegmatis codifica para uma proteína que corresponde a uma bomba de efluxo pertencente à família MFS, sendo a principal bomba de efluxo desta espécie [85]. Foi a primeira bomba de efluxo descrita no género *Mycobacterium*, e é capaz de usar como substrato as fluoroquinolonas, acridina e o brometo de etídio [82, 123].

Pensa-se que os mecanismos de efluxo favorecem a aquisição e a estabilização de outros mecanismos de resistência, como por exemplo, mutações. Segundo esta hipótese, as bombas de efluxo garantem a exposição da bactéria a menores concentrações de antibiótico, permitindo que nesse período ocorram mutações que confirmem à célula uma resistência de alto nível e estável [55, 75]. No caso da tuberculose, o tratamento prolongado e os diferentes estados de actividade metabólica em que as células se podem encontrar, aliados a eventuais faltas de adesão à terapêutica, potenciam a exposição a concentrações sub-inibitórias de fármacos, o que resulta na selecção de populações com mutações espontâneas. A ocorrência de efluxo como uma primeira resposta da célula que lhe permite sobreviver até à ocorrência de mutações potenciam o aparecimento da resistência e consequente falha terapêutica. A relação dos sistemas de efluxo micobacterianos e a resistência aos fármacos já é conhecida há algum tempo, mas hoje sabe-se que têm um papel importante no desenvolvimento de resistências [97]. Em *M. tuberculosis* foi já descrito o papel dos sistemas de efluxo como uma primeira resposta à exposição a isoniazida [12, 55].

Assim, torna-se necessário compreender o mecanismo molecular e funcional por detrás da resistência mediada por efluxo em *M. tuberculosis*, e usar esse conhecimento para inibir a actividade desses sistemas [53, 123]. Uma vez que os sistemas de efluxo bacterianos estão dependentes da energia celular [50], seja sob a forma de gradiente protónico/iónico, seja sob a forma de ATP, uma melhor compreensão da relação entre o fornecimento de energia pela cadeia transportadora de electrões e a actividade dos sistemas de efluxo poderá fornecer importantes dados para a exploração deste alvo celular no desenvolvimento de formas alternativas de combate à tuberculose.

1.3.2 Inibidores dos sistemas de efluxo

Estudos realizados demonstram que a inibição dos sistemas de efluxo associados a resistência aos antibióticos pode tornar os microrganismos, como por exemplo, *M. tuberculosis*, mais susceptíveis aos antibióticos usados na terapêutica [65]. A análise do genoma de *M. tuberculosis* mostrou a existência de vários genes que codificam para bombas de efluxo [27]. No estudo desenvolvido por Machado *et al.* [55], verificou-se que estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida, quando expostas a este antibiótico, aumentam a expressão de genes que codificam para bombas de efluxo. Deste modo, os sistemas de efluxo são considerados como possíveis alvos de novos compostos [50, 57]. Uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da tuberculose consiste na combinação de compostos inibidores dos sistemas de efluxo com a terapia antimicobacteriana usada actualmente [93, 123].

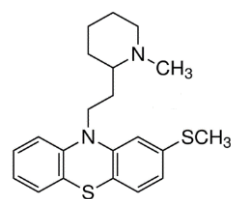
Estão descritos na literatura diversos compostos com actividade inibitória de sistemas de efluxo, dos quais se destacam as fenotiazinas [58]. Estes compostos são conhecidos pelas suas propriedades antipsicóticas, e por isso, usados no tratamento de doenças psíquicas [3, 4, 69]. São compostos aromáticos derivados do azul de metileno e podem ser divididos em três grupos: compostos aminoalquílicos (**clorpromazina** (CPZ)); piperidinas (**tioridazina** (TZ)); e piperazinas [123]. As fenotiazinas são constituídas por duas unidades principais: uma grande estrutura de anéis heterocíclicos e uma cadeia lateral ligada ao átomo de azoto [107]. O primeiro composto desta classe a ser sintetizado foi a clorpromazina, em 1952 [51]. A sua acção contra micobactérias foi descrita com o aparecimento de estirpes resistentes aos fármacos, devido à necessidade de terapias alternativas para o combate destas estirpes [3]. A actividade das fenotiazinas como inibidores de efluxo foi já demonstrada para diferentes micobactérias, nomeadamente em *M. smegmatis* e no complexo *M. avium* [81], e em *M. tuberculosis* [55]. Estes compostos apresentam uma boa biodisponibilidade e ausência de resistência cruzada com antibióticos, o que encoraja a sua utilização na investigação de novos fármacos e estratégias de tratamento contra a tuberculose [99].

Entre as duas fenotiazinas acima descritas, a tioridazina é aquela que apresenta um maior efeito inibitório em *M. tuberculosis* sensível e multi- e extensivamente resistente aos fármacos [7, 123]. Em modelos de ratinhos infectados com *M. tuberculosis*

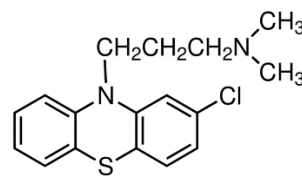
verificou-se que a tioridazina reduz o número de microrganismos presentes nos pulmões, bem como a percentagem de pulmão afectada [99]. Esta actividade da tioridazina foi demonstrada num estudo recente realizado por Abbate *et al.* [1], em que este composto foi co-administrado com antibióticos no tratamento de doentes com tuberculose extensivamente resistente.

A estrutura das fenotiazinas pode ser alterada de modo a torná-las mais eficientes [123], sendo possível obter compostos com actividade antipsicótica e antimicobacteriana semelhante. As fenotiazinas possuem uma estrutura de três anéis, em que os átomos de enxofre e azoto estão ligados a dois anéis de benzeno [123]. Substituindo o átomo de azoto por um átomo de carbono no anel central obtêm-se compostos do grupo dos tioxantenos, do qual o **flupentixol** faz parte. Este composto está descrito como o mais potente da classe [46] e é normalmente usado como fármaco antipsicótico no tratamento da esquizofrenia e depressão [42]. Além disso, o flupentixol apresenta actividade contra *M. avium* e *M. intracellulare* [46]. Outro grupo com efeito farmacológico similar ao das fenotiazinas são as butirofenonas, onde se inclui o **haloperidol**, que é também um antipsicótico usado no tratamento da esquizofrenia [14, 106]. Este composto apresenta actividade contra *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* [77].

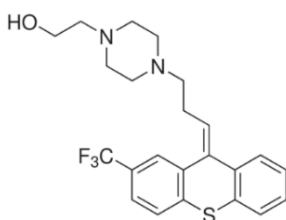
Na Figura 3 pode-se observar a estrutura química dos compostos da classe das fenotiazinas, tioridazina e clorpromazina, bem como de compostos com actividade semelhante, flupentixol e haloperidol.



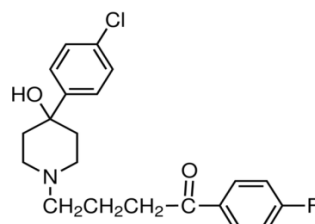
Tioridazina



Clorpromazina



Flupentixol



Haloperidol

Figura 3 – Estrutura química de compostos da classe das fenotiazinas e de outros compostos [92].

O mecanismo pelo qual as fenotiazinas inibem a actividade de efluxo em micobactérias ainda não é claro, pensando-se que poderá ocorrer por interferência com alvos celulares envolvidos na obtenção de energia para o funcionamento dos sistemas de efluxo (enzima NDH-2, ATP sintetase, formação da FMP) [11, 45]. De entre estes possíveis alvos, diversos estudos descritos na literatura demonstram a acção inibitória destes compostos ao nível da cadeia respiratória de *M. tuberculosis*, nomeadamente na enzima NDH-2 [78, 125, 132]. As fenotiazinas são capazes de bloquear a transferência de electrões para a menaquinona, o que resulta num aumento dos níveis de oxigénio intracelular impedindo os bacilos de entrarem em hipoxia. Assim, estes compostos podem acelerar o período de tratamento da tuberculose interferindo com os bacilos em dormência e tornando os antibióticos mais efectivos [89, 127].

Além dos mecanismos de acção acima descritos, considera-se que as fenotiazinas podem inibir os canais de cálcio, provocando uma diminuição dos níveis intracelulares de cálcio, essencial à sobrevivência dos bacilos no interior dos macrófagos humanos [56]. Outro mecanismo de acção descrito para estes compostos corresponde a alterações ao nível do DNA celular, nomeadamente na reparação e/ou sinalização de crescimento, e ainda por interferência com proteínas de replicação de DNA [103]. As fenotiazinas

apresentam ainda actividade ao nível da membrana celular, nomeadamente na estrutura membranar, provocando alterações na sua homogeneidade e fluidez [43, 89].

Perante os possíveis diferentes mecanismos de acção, estes compostos são considerados uma classe de fármacos com baixa especificidade a nível celular, o que diminui a probabilidade de desenvolvimento de estirpes resistentes durante o tratamento [81]. Na Figura 4 é apresentado um esquema descrevendo os diferentes modos de acção das fenotiazinas já descritos em micobactérias.

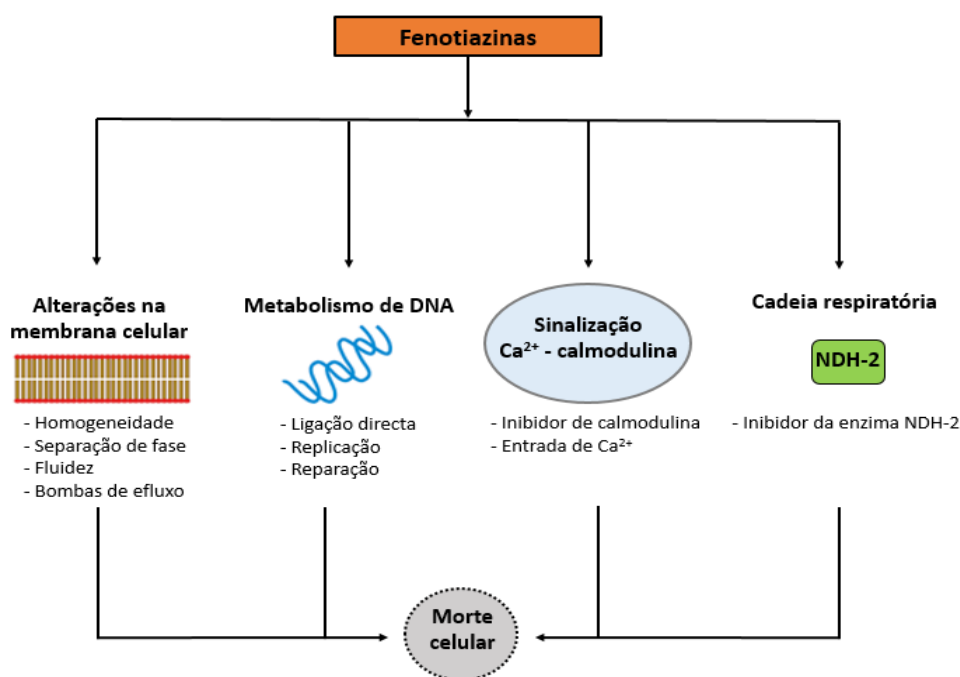


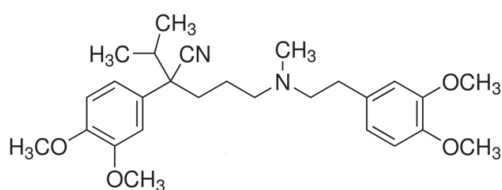
Figura 4 – Possíveis modos de acção das fenotiazinas contra *M. tuberculosis* (adaptado de Sharma *et al.* [89]).

Para além das fenotiazinas, encontram-se descritos na literatura outros compostos com actividade como inibidores de efluxo em micobactérias, cujo mecanismo de acção poderá igualmente passar por alterações na cadeia de transporte de electrões e consequente interferência com o funcionamento dos sistemas de efluxo.

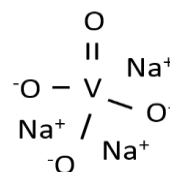
O **verapamil** (VP) é também um inibidor de canais de cálcio, tal como as fenotiazinas. Na clínica este composto é usado para o tratamento de hipertensão e arritmia cardíaca [8]. A capacidade deste composto para inibir o efluxo foi já descrita em *M. smegmatis*, complexo *M. avium* e *M. tuberculosis* [81].

Para além deste composto, existem ainda outros conhecidos por apresentarem actividade como inibidores do efluxo, como por exemplo, o ortovanadato de sódio (ORT), 1-(1-naftilmetil)piperazina (NMP) e o carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP). O **ortovanadato de sódio** é um inibidor de ATPases, e por isso, é capaz de inibir bombas de efluxo ou qualquer outro sistema que use a hidrólise de ATP como fonte de energia [73, 133]. A **NMP** faz parte do grupo das arilpiperazinas. Este composto actua por permeabilização da membrana externa das células; a sua actividade como inibidor de efluxo celular está descrita em *Escherichia coli*, mas não em micobactérias [20, 88]. Em relação ao **CCCP**, este composto é um dissipador do gradiente protónico estabelecido durante o normal funcionamento da cadeia de transporte de electrões, e por isso, capaz de afectar a actividade de efluxo celular [21].

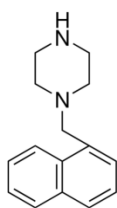
Na Figura 5 apresentam-se as estruturas químicas dos compostos acima descritos com actividade de inibição do efluxo celular.



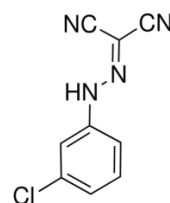
Verapamil



Ortovanadato de sódio



NMP



CCCP

Figura 5 – Estrutura química de compostos descritos como inibidores de efluxo [92].

1.4 Objectivos da Dissertação

A tuberculose continua a ser uma doença associada a elevadas taxas de mortalidade em todo o mundo. Nos últimos anos tem-se registado um aumento de casos de tuberculose multi- e extensivamente resistente aos fármacos usados no tratamento. Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento é necessário, com uma aposta em novos fármacos com diferentes alvos terapêuticos. Pretende-se diminuir o tempo de tratamento da doença e também prevenir e combater o aparecimento de estirpes multi- e extensivamente resistentes. Esta Dissertação tem como principal objectivo avaliar a enzima NDH-2 como potencial alvo no desenvolvimento de novos compostos anti-tuberculose. Esta enzima desempenha um papel fundamental no funcionamento da cadeia de transporte de electrões em *M. tuberculosis* e, consequentemente, na produção de energia necessária ao funcionamento de alguns sistemas de efluxo. O efluxo tem sido considerado um elemento importante no desenvolvimento de estirpes resistentes, e deste modo, pretende-se compreender a relação entre a actividade da enzima NDH-2 e a energia necessária ao funcionamento dos sistemas de efluxo, recentemente reconhecidos como essenciais nos primeiros passos de desenvolvimento de resistência aos compostos antimicrobianos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Estirpes bacterianas

A estirpe de *M. tuberculosis* H37Rv corresponde à estirpe de referência de *M. tuberculosis* e foi usada para a amplificação do gene *ndh-2* [132].

A estirpe de *M. smegmatis* mc²155 foi utilizada ao longo deste trabalho para a realização dos ensaios de electroporação e expressão da proteína NDH-2. Esta estirpe corresponde a um derivado da estirpe selvagem de *M. smegmatis* ATCC607, e apresenta modificações na composição e estrutura da sua membrana celular, o que lhe confere elevada eficiência nos processos de transformação [34, 96]. A electroporação da estirpe *M. smegmatis* mc²155 deu origem à estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh-2*, que foi usada para os ensaios de determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs) e avaliação da actividade de efluxo, com e sem inibidores de efluxo, em comparação com a estirpe original, e ainda na sobre-expressão da proteína NDH-2 para o estudo do efeito de compostos inibidores de efluxo na actividade enzimática desta proteína.

Durante o trabalho foram também utilizadas estirpes de *Escherichia coli*, nomeadamente JOV MM140:pMind, que foi usada para extracção do plasmídeo utilizado nos ensaios de clonagem e expressão proteica, e a estirpe DH5α utilizada nos ensaios de transformação como células competentes.

2.1.2 Outro material biológico

O plasmídeo pMind, isolado originalmente de *Corynebacterium glutamicum*, corresponde a um vector de transporte de genes entre células de *E. coli* e micobactérias, que possui uma região indutível à tetraciclina (TET) [17, 129]. Este sistema foi usado para a expressão da proteína NDH-2. O vector permitiu a realização dos ensaios de clonagem, transformação e expressão proteica. A canamicina (KAN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi usada como marcador de selecção para este plasmídeo nas culturas de *M. smegmatis* e *E. coli*. Na Figura 6 está representado o mapa do plasmídeo pMind.

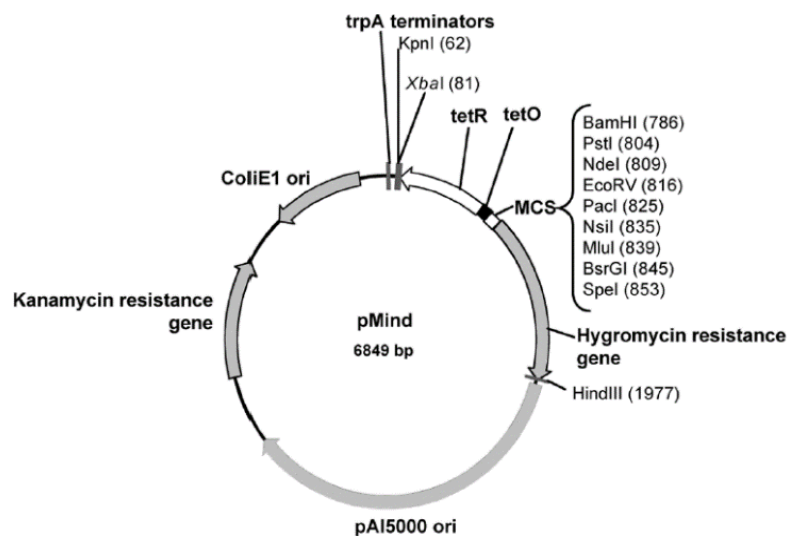


Figura 6 – Mapa do plasmídeo pMind [17].

Na Tabela 1 encontram-se as sequências dos “primers” utilizados ao longo deste trabalho.

Tabela 1 – Sequências dos “primers” utilizados.

“Primers”	Sequência nucleotídica (5’-3’)	Amplicação	Referência
ndh_fw	AGCTATGGATCCATGAGTCCCCAGCAAGAACCCACA	1.391 pb	[132]
ndh_rv	AGCTATACTAGTCTAATGATGATGATGATGATGGCT GGCCACCTTAGCGCTTGC		
ndh3S	GACAGATCGCCGAGCTGGC	372 pb	[48]
ndh3AS	TGGACAGGTCGGGCAGCAC		
lig1_fw ¹	GTGCGGAAGTGCCAGTAGA	406 pb	Este trabalho
lig1_rv ¹	AGTACGGGGTTGGTGCTCT		
lig2_fw ¹	CTGTCGTGGACGGTGACTT	396 pb	Este trabalho
lig2_rv ¹	GAACAGGTGATGGGTGGTG		

(1) Invitrogen, “Life Technologies”, Paisley, Reino Unido. **fw**: “forward”; **rv**: “reverse”; **S**: “sense”; **AS**: “antisense”. A zona sombreada na sequência do “primer” ndh_rv corresponde à região codificante da cauda de histidinas que é útil para a purificação da proteína NDH-2.

Os marcadores 1 kb DNA “Ladder Gene Ruler” e DNA λ HindIII (Fermentas, Ontário, Canadá) serviram como referência para a análise de DNA plasmídico, produtos de amplificação por PCR e produtos de restrição, por electroforese em gel de agarose a 0,7% (p/v). O marcador NZY “Colour Protein Marker” II (Nzyteck, Portugal) serviu como referência para a análise de proteínas nos géis SDS-PAGE (“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”).

2.1.3 Meios de cultura, soluções e enzimas

Todos os meios de cultura e soluções utilizados neste trabalho foram preparados com água destilada, e esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos a 1 bar, excepto as soluções com glicerol e de glucose (esterilizadas a 110°C).

Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se descritas as composições e condições de preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas, respectivamente.

Tabela 2 – Composição dos meios de cultura.

Meio de cultura	Composição (por litro)
Luria-Bertani Agar (LA)	10 g de peptona de caseína ¹ ; 5 g de extrato de levedura granulado ¹ ; 10 g de cloreto de sódio ² ; 20 g de agar microbiológico ³ ; pH 7,3 \pm 0,2 a 25°C
Luria-Bertani Broth (LB)	10 g de peptona de caseína ¹ ; 5 g de extrato de levedura granulado ¹ ; 10 g de cloreto de sódio ² ; pH 7,3 \pm 0,2 a 25°C
Yeast Extract Tryptone Agar (2xYT)	16 g de triptona ⁵ ; 10 g de extrato de levedura granulado ¹ ; 5 g de cloreto de sódio ² ; 15 g de agar microbiológico ³ ; pH 7,0 \pm 0,2 a 25°C
Yeast Extract Tryptone Broth (2xYT)	16 g de triptona ⁵ ; 10 g de extrato de levedura granulado ¹ ; 5 g de cloreto de sódio ² ; pH 7,0 \pm 0,2 a 25°C
Middlebrook 7H9⁴	0,5 g sulfato de amónio; 0,5 g de ácido L-glutâmico; 0,1 g de citrato de sódio; 0,0001 g de piridoxina; 0,0005 g de biotina; 2,5 g de fosfato dissódico; 1,0 g de fosfato monopotássico; 0,04 g de citrato de amónio férrico; 0,05 g de sulfato de magnésio; 0,0005 g de cloreto de cálcio; 0,001 g de sulfato de zinco; 0,001 g de sulfato de cobre; pH 6,6 \pm 0,2 a 25°C

Tabela 2 (cont.)

Meio de cultura	Composição (por litro)
Middlebrook 7H11 ⁴	1,0 g de caseína pancreática digerida; 0,5 g de ácido L-glutâmico; 0,4 g de citrato de sódio; 0,001 g de piridoxina; 0,0005 g de biotina; 0,04 g de citrato de amônio férrico; 0,5 g de sulfato de amônio; 1,5 g de fosfato de sódio; 1,5 g de fosfato monopotássico; 0,05 g de sulfato de magnésio; 15 g de agar; 0,001 g de verde de malaquite; pH 6,6 ± 0,2 a 25°C

(1) Merck, Darmstadt, Alemanha; (2) Panreac, Barcelona, Espanha; (3) Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra; (4) Difco, Madrid, Espanha; (5) Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

Tabela 3 – Composição e condições de armazenamento das soluções.

Solução	Composição e condições de armazenamento
Acetato de Sódio ¹ 3 M	246 mg em 1 mL H ₂ O, pH 5,2
Brometo de etídio ² (EtBr)	10 mg em 1 mL H ₂ O, a 4 °C, ao abrigo da luz
Cloreto de Cálcio ² 1 M	111 mg em 1 mL H ₂ O, pH 7,0
EDTA ² 0,5 M	186,1 mg em 1 mL H ₂ O, pH 8,0
GTE	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl ² ; 10 mM EDTA ² , pH 8,0
Glucose ² 20%	200 mg em 1 mL H ₂ O, a -20°C
KCN ² 1 M	32,56 mg em 1 mL tampão HEPES/fosfato
Menaquinona ² 10 mM	4,4 mg em 1 mL etanol ³
NADH ² 25 mM	17,6 mg em 1 mL tampão HEPES/fosfato
PMSF 100 mM	17,42 mg em 1 mL isopropanol ² , a -20°C
Soro Fisiológico 0,85%	8,5 mg NaCl ³ em 1 mL H ₂ O
TAE 1X	40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA ² , pH 8,0
Tampão de Aplicação de géis de agarose ⁴	10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,015% (p/v) azul de bromofenol; 0,015% (p/v) xileno cianol; 30% (v/v) glicerol; 30 mM EDTA, a 4°C
Tampão de Aplicação de géis SDS-PAGE	66 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% (p/v) SDS ² ; 26% (v/v) glicerol ² ; 717 mM β-mercaptoetanol ¹ ; 0,01% (p/v) azul de bromofenol ² , a 4°C
Tampão Fosfato de Sódio 100 mM	120 mg NaH ₂ PO ₄ ² em 100 mL H ₂ O, pH 6,8, a 4 °C
Tampão HEPES ² /fosfato	50mM HEPES ² , 100mM de fosfato de sódio, 1mM de PMSF ² , pH 6,8, a 4 °C

Tabela 3 (cont.)

Solução	Composição e condições de armazenamento
Tampão TE	10 mM Tris-HCl2; 1 mM EDTA2 pH 8,0, a 4 °C
Tris-HCl2 1 M	121mg em 1 mL H2O, pH 8,0

(1) Merck, Darmstadt, Alemanha; (2) Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; (3) Panreac, Barcelona, Espanha.
(4) Fermentas, Ontário, Canadá.

Na Tabela 4 encontram-se descritas as enzimas usadas ao longo deste trabalho, e nas Tabelas 5 e 6 o modo de preparação e armazenamento de antibióticos e inibidores de efluxo, respectivamente.

Tabela 4 – Enzimas utilizadas neste trabalho.

Enzimas	Concentração
DNA ligase T4²	5 U/μL
Lisozima¹	100 mg/mL (em H ₂ O)

(1) Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; (2) Thermo Scientific, EUA. As enzimas foram armazenadas a -20°C.

Tabela 5 – Antibióticos utilizados e modo de preparação.

Antibiótico ¹	Modo de preparação
Amicacina (AMK)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril
Canamicina (KAN)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril
Capreomicina (CAP)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril
Claritromicina (CLA)	10 mg em 1 mL DMSO ²
Eritromicina (ERY)	10 mg em 1 mL DMSO ²
Etambutol (EMB)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril
Gentamicina (GET)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril
Isoniazida (INH)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril
Ofloxacina (OFX)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril com 1% (v/v) NaOH 10M
Rifampicina (RIF)	10 mg em 1 mL DMSO ²
Tetraciclina (TET)	5 mg em 1 mL metanol ²

(1) Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; (2) Merck, Darmstadt, Alemanha. As soluções foram armazenadas a -20°C.

Tabela 6 – Inibidores de efluxo utilizados e modo de preparação.

Inibidor de efluxo¹	Modo de preparação
1-(1-Naftilmetil)piperazina (NMP)	10 mg em 1 mL DMSO ² (MM=226,32 g/mol)
Carbonil Cianeto m-Clorofenilhidrazona (CCCP)	5 mg em 10 mL (5 mL H ₂ O bidestilada estéril e 5 mL metanol ²) (MM= 204,62 g/mol)
Clorpromazina (CPZ)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril (MM= 355,33 g/mol)
Flupentixol (FPX)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril (MM= 507,44 g/mol)
Haloperiol (HAL)	10 mg em 1 mL DMSO ² (MM= 375,85 g/mol)
Ortovanadato de Sódio (ORT)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril (MM= 183,91 g/mol)
Tioridazina (TZ)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril (MM= 407,04 g/mol)
Verapamil (VP)	10 mg em 1 mL H ₂ O bidestilada estéril (MM= 491,06 g/mol)

(1) Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; (2) Merck, Darmstadt, Alemanha. As soluções foram armazenadas a -20°C.

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

A estirpe de *E. coli* JovMM140:pMind foi inoculada em meio LA e crescida durante a noite a 37°C. Após o crescimento foi feita a repicagem para meio LB, e crescida durante a noite a 37°C numa estufa com agitação a 180 rpm (MaxQ4000, Thermo Scientific). Os meios de cultura foram suplementados com 50 µg/mL de canamicina. A primeira passagem por meio sólido permite verificar uma possível contaminação.

No processo de transformação realizado em *E. coli* foram utilizadas células competentes da estirpe *E. coli* DH5α. Os transformantes foram seleccionados em placas de meio 2xYT suplementado com 50 µg/mL de canamicina, após incubação durante a noite a 37°C.

A estirpe *M. smegmatis* mc²155 foi crescida em meio líquido 7H9 suplementado com 0,2% de glicerol (Sigma-Aldrich), 10% de OADC (Becton and Dickinson, EUA) e 0,05% de Tween 80 (Sigma-Aldrich). Quando necessário, foram adicionadas esferas de

vidro ao meio de cultura, de modo a evitar a formação de agregados durante o crescimento. A incubação foi realizada a 37°C com agitação a 180 rpm, durante 48 a 72 horas, até atingir o valor de DO₆₀₀ de 0,8. A estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh*-2 que resultou do processo de transformação, e designada ao longo desta Dissertação por *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2, foi inoculada nas mesmas condições, em meio de cultura suplementado com 50 µg/mL de canamicina. Foram realizadas culturas desta estirpe em meio sólido 7H11 suplementado com 0,5% de glicerol e 10% de OADC e incubadas em estufa a 37°C durante 72 horas. As colónias transformantes de *M. smegmatis* foram mantidas a 4°C em “slants” de meio 7H11 [54]. Para realizar as passagens para meio líquido das estirpes de *M. smegmatis* foi diluída 1:100 uma suspensão de inóculo a 0,5 McFarland, e foram utilizados 100 µL para inocular 10 mL em meio 7H9. Esta proporção foi mantida ao longo do trabalho experimental. Paralelamente a cada incubação foi realizado um controlo de antibiótico com a estirpe *M. smegmatis* mc²155. Esta foi inoculada em meio 7H9 com 50 µg/mL de canamicina de modo a verificar a eficácia do antibiótico.

Todas as estirpes foram mantidas em “stock” a -80°C com 10% (v/v) de glicerol.

2.2.2 Controlo de contaminação

A coloração de Ziehl-Neelsen [16] foi realizada como um controlo de contaminação para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2. Esta coloração permitiu verificar a ausência de microrganismos não BAAR, como outras bactérias e fungos. Para a realização desta coloração foram efectuados esfregaços em lâminas e fixados à chama, que foram posteriormente cobertos com fucsina fenicada e aquecida até à emissão de vapores. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas e descoradas com ácido sulfúrico (Pronalab, Chile) e etanol a 25% (Panreac), e aplicou-se o corante azul-de-metileno como agente contrastante. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com a objectiva de imersão.

Para além da coloração, as culturas as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 foram plaqueadas em gelose de sangue (Columbia III Agar 5% “Sheep Blood”, Becton and Dickinson), com incubação a 37°C durante a noite, para verificar a ausência de microrganismos contaminantes.

2.2.3 Electroforese em gel de agarose

Os plasmídeos e produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Oxoid) a 0,7% (p/v) com 0,25 µg/mL de EtBr, em tampão TAE 1X, sujeitas a uma voltagem de 80 V durante 1 hora. Foi utilizado o sistema Wide Mini-sub cell GT (Bio-Rad, EUA) com uma fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech. Em casos excepcionais de baixa concentração de produto, foi realizado um passo adicional de coloração do gel com EtBr, seguida de uma descoloração em água destilada. Para visualização dos géis foi usado o aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad).

Paralelamente às amostras aplicadas no gel de agarose, foram aplicados os marcadores de peso molecular 1 kb e λ HindIII que permitem fazer uma comparação presuntiva do tamanho dos fragmentos de DNA e concentração das amostras.

2.2.4 Reacção de amplificação do gene *ndh-2* por PCR

A amplificação do gene *ndh-2* de *M. tuberculosis* foi realizada com os “primers” *ndh_fw* e *ndh_rv* descritos na Tabela 1, a partir de DNA genómico extraído com o sistema “QIAamp DNA Mini Kit” (Qiagen, Alemanha) segundo as indicações do fabricante.

Para realizar a reacção de amplificação foi preparada uma mistura de reacção de 45 µL composta por 1X tampão *Taq* (Fermentas), 2U de *Taq* Polimerase (Fermentas), 20 pmol de cada “primer”, 200 µM de cada dNTP (GE Healthcare, Inglaterra) e 1,75 mM de MgCl₂ (Fermentas). À mistura de reacção foram adicionados 5 µl de DNA genómico. Foi realizado um controlo negativo, em que o volume de DNA foi substituído por água bidestilada estéril.

A reacção de PCR foi realizada num termociclador “Mastercycler personal 5332” (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, emparelhamento a 54°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 2 minutos. A reacção terminou com um passo de extensão final a 72°C durante 10 minutos (adaptado de Yano *et al.* [132]).

2.2.5 Purificação de produtos de PCR

A purificação de produtos de PCR foi realizada com o sistema “Wizard® PCR Preps DNA Purification System” (Promega, Madison, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Ao produto de PCR foram adicionados 100 µL de solução de purificação e 1 mL de resina, previamente aquecida a 37°C, segundo as indicações do fabricante. Adicionou-se esta suspensão a uma seringa, e fez-se passar a suspensão pela coluna fornecida. Adicionaram-se 2 mL de isopropanol a 80% (Sigma-Aldrich) à seringa e fez-se passar esta solução pela coluna. Realizou-se um passo de centrifugação da coluna a 13.000 rpm durante 2 minutos (Heraeus Biofuge Pico, DJB labcare, Inglaterra). Transferiu-se a coluna para um novo tubo e adicionaram-se 50 µL de água livre de nucleases previamente aquecida a 65°C para obter rendimentos superiores, com uma centrifugação a 13.000 rpm durante 20 segundos. A suspensão obtida contém o produto de PCR purificado.

A presença do fragmento de DNA foi verificada por electroforese em gel de agarose como descrito no ponto 2.2.3. O DNA purificado foi armazenado a -20°C.

2.2.6 Extração de DNA plasmídico

2.2.6.1 Extração de DNA plasmídico de *E. coli*

A extração de DNA plasmídico foi realizada com o sistema “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega). Este sistema permite a realização de um protocolo simples e rápido de isolamento de DNA plasmídico. Baseia-se na lise alcalina e passagem dos ácidos nucleicos por uma coluna onde ficará retido o DNA plasmídico. O protocolo fornecido pelo fabricante foi aplicado quer à estirpe *E. coli* Jov MM140:pMind, quer aos transformantes obtidos das células de *E. coli* DH5α.

Após o crescimento das bactérias, centrifugaram-se os 5 mL de cultura a 7.500 rpm durante 10 minutos (centrífuga 2-16PK, Sigma-Aldrich). Adicionaram-se 250 µL de solução de ressuspensão, 250 µL de solução de lise, 10 µL de solução de protease alcalina e 350 µL de solução de neutralização, seguindo as indicações do fabricante. Centrifugou-se a suspensão obtida a 13.000 rpm durante 10 minutos, e transferiu-se o sobrenadante

para a coluna. Fez-se nova centrifugação a 13.000 rpm durante 1 minuto, e rejeitou-se a suspensão que ficou no tubo. A coluna foi lavada duas vezes, primeiro com 750 µL de solução de lavagem e de seguida com 250 µL, com centrifugações a 13.000 rpm intercaladas durante 1 e 2 minutos, respectivamente. Transferiu-se a coluna para um novo tubo e adicionaram-se 100 µL de água livre de nucleases, realizando uma centrifugação a 13.000 rpm durante 1 minuto para recolha do DNA plasmídico.

A presença de plasmídeo foi verificada por electroforese em gel de agarose como descrito no ponto 2.2.3. O DNA plasmídico foi armazenado a -20°C.

2.2.6.2 Extracção de DNA plasmídico de *M. smegmatis*

Para o isolamento do DNA plasmídico a partir de células de *M. smegmatis* foi usado o sistema “QIAGEN® Plasmid Midi Kit” (Qiagen). Este sistema permite a extracção de plasmídeos a partir de volumes superiores de cultura. O protocolo utilizado foi modificado relativamente ao protocolo fornecido pelo sistema da Qiagen, com uma incubação inicial das células com lisozima [72], uma vez que estes sistemas se encontram optimizados para *E. coli*.

Quando as culturas de 50 mL atingiram uma DO₆₀₀ entre 0,80 – 1,0, as células foram recolhidas por centrifugação a 7.500 rpm durante 5 minutos. Foram ressuspendidas em 2,5 mL de solução GTE suplementado com lisozima a uma concentração final de 20 mg/mL, e incubadas durante 3 horas a 37°C com agitação suave (50 rpm) em estufa com agitação (Biometra OV3, AlfaGene, Nova Jérсия, EUA).

Após este período de incubação, a suspensão foi centrifugada a 7.500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 4 mL de tampão P1 (armazenado a 4°C), 4 mL de tampão P2 e 4 mL de tampão P3 (gelado), seguindo as instruções do fabricante, e incubou-se a suspensão 15 minutos em gelo. Realizou-se nova centrifugação a 16.000 rpm durante 30 minutos a 4°C (centrífuga J2-21, Beckman Instruments, California, EUA). Centrifugou-se o sobrenadante em iguais condições durante 15 minutos. Equilibrou-se a coluna com 4 mL de tampão QBT, e de seguida, aplicou-se o sobrenadante à coluna. Realizaram-se duas lavagens da coluna com 10 mL de tampão QC. Para eluir o DNA foram adicionados 5 mL de tampão QF à coluna, previamente aquecido a 65°C.

Por último, realizou-se um passo de concentração do DNA por precipitação, adicionando ao eluado 3,5 mL de isopropanol a 70% (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente. Centrifugou-se a suspensão a 16.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Decantou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 2 mL de etanol a 70% (Panreac), repetindo-se a centrifugação durante 10 minutos. O precipitado foi seco para garantir que fica livre de etanol, e ressuspendido em 200 µL de tampão TE.

A presença de plasmídeo foi verificada por electroforese em gel de agarose como descrito no ponto 2.2.3. O DNA plasmídico foi armazenado a -20°C.

2.2.7 Reacção de ligação do gene *ndh-2* ao plasmídeo pMind

Para a reacção de ligação entre o plasmídeo pMind e a sequência do gene *ndh-2* foram realizadas as reacções de linearização com duas enzimas de restrição, a *Bam*HI-HF e a *Spe*I-HF (New England BioLabs Inc., Reino Unido) que actuam no “Multiple Cloning Site” (MCS) do plasmídeo e nas extremidades do gene (as sequências encontram-se nos “primers” usados para a reacção de amplificação). As reacções foram realizadas para um volume final de 50 µL, com 0,5 µL de cada enzima, tampão, água bidestilada e DNA numa concentração de 10 ng/µL, durante 2 horas a 37°C num banho de água (Grant JB Series, Reino Unido). No caso da enzima *Spe*I-HF foi necessária a adição de BSA (albumina de soro bovino) a uma concentração final de 100 µg/mL. O volume de cada enzima foi colocado em excesso relativamente às concentrações indicadas pelo fabricante para cada quantidade de DNA, de modo a garantir uma restrição eficiente. As concentrações de DNA em cada amostra foram determinadas por espectrofotometria com o aparelho NanoDrop (Thermo Scientific).

Após o corte das sequências com iguais enzimas de restrição, foi realizado o passo de clonagem do gene *ndh-2* no plasmídeo pMind, utilizando o protocolo de precipitação de DNA em etanol (adaptado de Sambrook *et al.*, [84]). Adicionou-se 45 ng de plasmídeo pMind a 675 ng do fragmento de DNA correspondente ao gene *ndh-2*, com a cauda de histidinas, anteriormente amplificado, juntamente com 10% de acetato de sódio 3 M, glicogénio e três vezes o volume de etanol absoluto. A solução foi incubada a -70°C durante 1 hora, com posterior centrifugação a 13.000 rpm a 4°C, durante 30 minutos (centrífuga 3K18, Sigma-Aldrich). Posteriormente, fez-se uma lavagem com etanol a

70% arrefecido, seguindo-se uma nova centrifugação em condições iguais. Desperdiçou-se o sobrenadante e deixou-se evaporar todo o etanol, adicionando de seguida o tampão 2X necessário à actividade da enzima, água livre de nucleases, e finalmente a enzima DNA ligase T4, tendo-se incubado a 4°C durante a noite. O produto de ligação foi armazenado a -20°C.

Para verificar o sucesso da reacção de ligação procedeu-se à linearização do produto de ligação pMind:*ndh-2* com a enzima *Bam*HI-HF (New England BioLabs) com as mesmas condições aplicadas nas reacções de linearização do plasmídeo pMind e do gene *ndh-2*. O resultado foi verificado por electroforese em gel de agarose.

O produto de ligação foi também verificado por sequenciação das duas cadeias (Stab Vida), utilizando os “primers” *ndh_fw* e *ndh_rv*, *ndh3S* e *ndh3AS*, *lig1_fw* e *lig1_rv*, *lig2_fw* e *lig2_rv* (Tabela1), que cobrem quer as zonas de ligação entre as duas seqüências de DNA, quer o próprio gene *ndh-2*.

2.2.8 Transformação de bactérias com DNA plasmídico

2.2.8.1 Transformação de *E. coli*

- Preparação de células competentes

Para a propagação do produto de ligação (pMind:*ndh-2*) em *E. coli*, utilizou-se a estirpe DH5 α . Para preparar células competentes seguiu-se o método do cloreto de cálcio [84].

A partir de uma cultura de 10 mL desta estirpe na fase exponencial (DO₆₀₀ = 0,6), recolheram-se as células por centrifugação a 7.000 rpm durante 10 minutos. O sedimento foi ressuscitado em igual volume de 0,1 M de CaCl₂ a 4°C, e a suspensão incubada em gelo durante 20 a 30 minutos. Por fim, fez-se nova centrifugação a 7.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, o sedimento foi ressuscitado em 1 mL da solução de cálcio, distribuído em alíquotas de 100 μ L em criotubos arrefecidos e imediatamente congelados a -80°C.

- Transformação

Para a realização do protocolo de transformação do produto de ligação foram utilizados 50 µL de células competentes de *E. coli* DH5α e 4 µL do produto de ligação, com posteriores incubações em gelo (30 minutos) e a 42°C (1 minuto), provocando o choque térmico necessário à entrada do DNA nas células. De seguida, adicionou-se 500 µL de meio 2xYT líquido e incubou-se a 37°C durante 1 hora com agitação suave (180 rpm). Por último, as células foram semeadas em placas de meio 2xYT suplementado com canamicina a 50 µg/mL, e incubadas a 37°C durante a noite. Paralelamente foram realizados o controlo de viabilidade, o controlo de antibiótico e o controlo de esterilidade do meio de cultura.

Após o crescimento dos transformantes, foi realizada a sua passagem para meio 2xYT líquido suplementado com canamicina. Das culturas obtidas foi feito “stock” e armazenadas a -80°C, e de seguida, foi realizada a extracção de plasmídeo e a sua linearização para confirmação da presença do produto de ligação, como descrito nos pontos 2.2.6.1 e 2.2.7, respectivamente. A presença do produto de ligação foi verificada por electroforese em gel de agarose como descrito no ponto 2.2.3. O DNA plasmídico foi armazenado a -20°C, respectivamente.

2.2.8.2 Electrotransformação de *M. smegmatis*

- Preparação de células competentes

As células competentes de *M. smegmatis* foram preparadas a partir da estirpe *M. smegmatis* mc²155 [72]. Foi realizada uma cultura primária em 5 mL de meio 7H9 com adição de esferas. A incubação ocorreu a 37°C com agitação a 180 rpm. Aos 3 dias de incubação, quando a cultura atingiu uma DO₆₀₀ de 0,8, fez-se a passagem na proporção de 1:100, como descrito no ponto 2.2.1., para 5 mL de meio 7H9, com esferas e Tween 80. Esta nova cultura foi incubada até atingir a DO₆₀₀ de 0,8, nas mesmas condições de temperatura e agitação. Desta cultura foi feita a passagem para 100 mL de 7H9 com Tween 80, e incubou por igual período e condições. Por fim, fez-se a passagem para 250

mL de 7H9 com Tween 80. Quando a DO₆₀₀ atingiu, mais uma vez, 0,8, tornaram-se as células competentes para serem usadas posteriormente no ensaio de electroporação [72].

Para tornar as células de *M. smegmatis* competentes procedeu-se à sua incubação em gelo durante 90 minutos, o que permite aumentar a eficiência da electroporação. Para recolher as células fez-se um passo de centrifugação a 7.500 rpm durante 10 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, iniciaram-se as lavagens com glicerol frio a 10%, com a primeira lavagem com 90 mL de glicerol, depois 25 mL, 10 mL, e finalmente 5 mL. As condições de centrifugação entre cada lavagem foram mantidas. Ao sedimento das células foram adicionados 2,5 mL de glicerol a 10% (1:100 do volume de cultura original) para a preparação de “stock’s” [72]. As células competentes foram armazenadas a -80°C até posterior utilização.

- Electrotransformação

Para a realização da electrotransformação do plasmídeo pMind:*ndh-2* em células competentes de *M. smegmatis* mc²155 foram usados 400 µL de suspensão de células competentes para 5 µL de produto de ligação. Para a electroporação foi usada uma cuvette de 0,2 cm e recorreu-se ao aparelho “Gene Pulser” II (Bio-Rad), com a seguinte programação: 2,5 kV, 25 µF e 1000 Ω [72].

De seguida, fez-se um passo de incubação da suspensão em 5 mL de 7H9 (suplementado com OADC) durante 2 horas a 37°C. Centrifugou-se a suspensão e ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL de 7H9 (sem OADC e sem Tween 80). Destes 200 µL de suspensão, foram realizadas diluições seriadas, com soro fisiológico, e plaqueadas em placas de meio 7H11 suplementado com 50 µg/mL de canamicina [72]. Paralelamente, foram realizados o controlo de viabilidade, o controlo de antibiótico e o controlo de esterilidade do meio de cultura. As placas foram colocadas no interior de um saco selado e incubadas a 37°C durante 3 a 5 dias.

Após o crescimento dos transformantes *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* foi realizada a sua passagem para meio 7H9 suplementado com canamicina, que foram mantidos em “stock” a -80°C. A presença do plasmídeo com o gene *ndh-2* clonado foi confirmada por extracção de DNA plasmídico e sua linearização, como descrito nos pontos 2.2.6.2 e 2.2.7, respectivamente, seguida de uma electroforese em gel de agarose como descrito no

ponto 2.2.3. A correcta sequência do gene *ndh-2* foi confirmada por sequenciação. Uma vez que as concentrações de plasmídeo obtidas a partir de *M. smegmatis* foram baixas, realizou-se um passo prévio de concentração das amostras por evaporação em vácuo no aparelho Concentrator 5301 (Eppendorf).

2.2.9 Determinação de concentrações mínimas inibitórias

A concentração mínima inibitória (CMI) de um determinado composto é definida como a menor concentração desse composto capaz de inibir o crescimento visível de uma dada estirpe [52]. As CMIs de diversos antibióticos e inibidores de efluxo foram determinadas para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* pelo método de microdiluição, de acordo com as regras de CLSI [26]. As estirpes foram inoculadas em meio 7H9 com esferas e suplementado com OADC, num volume final de 10 mL, e incubadas a 37°C com agitação a 180 rpm até atingir o valor de DO₆₀₀ de 0,8. No caso da estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* foi adicionada tetraciclina para uma concentração final de 75 ng/mL quando o valor de DO₆₀₀ atingiu os 0,5 [17, 129].

Para preparar o inóculo realizou-se uma diluição da cultura equivalente a 0,5 McFarland em soro fisiológico, e diluiu-se esta suspensão (1:100) em meio 7H9. Os compostos foram diluídos por um factor de diluição 1:2. As placas foram colocadas no interior de um saco selado, e incubadas numa estufa a 37°C durante 3 a 5 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.2.9.1 Determinação de CMIs de antibióticos e inibidores de efluxo

Foram determinadas CMIs de antibióticos e inibidores de efluxo. Os antibióticos testados e respectivas gamas de valores foram os seguintes: isoniazida (0,25 a 32 µg/mL), rifampicina (1 a 128 µg/mL), etambutol (0,06 a 8 µg/mL), claritromicina (0,13 a 16 µg/mL), eritromicina (4 a 512 µg/mL), ofloxacina (0,06 a 8 µg/mL), canamicina (0,25 a 32 µg/mL), amicacina (0,06 a 8 µg/mL), gentamicina (0,25 a 32 µg/mL), capreomicina (0,13 a 16 µg/mL) e tetraciclina (0,06 a 8 µg/mL). Os inibidores de efluxo testados e respectivas gamas de valores foram os seguintes: tioridazina (0,47 a 60 µg/mL), verapamil (6,25 a 800 µg/mL), clorpromazina (0,47 a 60 µg/mL), flupentixol (0,47 a 60

µg/mL), haloperidol (4 a 512 µg/mL) ortovanadato de sódio (16 a 2048 µg/mL), NMP (4 a 512 µg/mL) e CCCP (1 a 128 µg/mL). Para além destes compostos, foi também determinada a CMI do brometo de etídio (0,09 a 12 µg/mL).

Foram usadas microplacas de 96 poços, com 200 µL de água destilada estéril nos poços periféricos e 100 µL de 7H9 suplementado com OADC nos restantes poços. Para cada composto a testar, juntaram-se 30 µL da solução de concentração intermédia do composto ao poço de concentração mais alta, com 70 µL de meio 7H9, e fizeram-se diluições seriadas (1:2) até ao último poço. De seguida, adicionaram-se 100 µL de inóculo a cada poço. Para cada composto foi realizado um controlo negativo (sem inóculo) e um controlo de crescimento (sem composto).

2.2.9.2 Determinação de CMI de antibióticos na presença de inibidores de efluxo

Foram ainda determinadas as CMIs de antibióticos na presença de inibidores de efluxo a concentrações de 1/4 (ou abaixo) da CMI para cada inibidor. Assim, para ambas as estirpes a concentração de cada inibidor foram as seguintes: tioridazina (7,5 µg/mL), verapamil (200 µg/mL), clorpromazina (15 µg/mL), flupentixol (15 µg/mL), haloperidol (64 µg/mL), ortovanadato de sódio (1024 µg/mL), NMP (128 µg/mL) e CCCP (8 µg/mL). A gama de concentrações para os antibióticos foi ajustada quando o valor de CMI não estava abrangido nos intervalos referidos no ponto 2.2.9.1.

Foram usadas microplacas de 96 poços, com 200 µL de água destilada estéril nos poços periféricos e 90 µL de 7H9 suplementado com OADC nos restantes poços. Para cada composto a testar, juntaram-se 30 µL da solução de concentração intermédia do antibiótico ao poço de concentração mais alta, com 60 µL de meio 7H9, e fizeram-se diluições seriadas (1:2) até ao último poço. De seguida, adicionou-se 10 µL de inibidor de efluxo a testar na concentração desejada a todos os poços com antibiótico e 100 µL de inóculo a cada poço. Para cada composto foi realizado um controlo negativo (sem inóculo) e controlo de crescimento (sem composto).

2.2.10 Determinação de actividade de efluxo por fluorometria em tempo real

Os ensaios de avaliação da actividade de efluxo de brometo de etídio das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 foram realizados através de um método fluorométrico semi-automático no termociclador Rotor-Gene 3000TM (Corbett Research, Sidney, Austrália). Este aparelho permite a leitura da fluorescência do brometo de etídio nos comprimentos de onda de excitação (530 nm) e emissão (585 nm) deste composto [121]. O EtBr emite fluorescência fraca em soluções aquosas, portanto, fora das células, tornando-se fluorescente no interior das mesmas. Deste modo, é possível avaliar a capacidade das células em acumularem maior ou menor quantidade deste composto, na presença e ausência de inibidores de efluxo, e ainda avaliar a capacidade de efluxo na presença desses compostos [50, 71, 82]. Neste trabalho os ensaios foram realizados na presença e ausência de glucose, que é considerada uma fonte energética para as bombas de efluxo, o que permitirá um aumento da sua actividade. Assim, na presença deste açúcar, espera-se que as células sejam capazes de expulsar maiores quantidades de EtBr, e ser detectada menor quantidade de fluorescência [70]. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

As estirpes foram inoculadas num volume de 10 mL de meio 7H9, e incubadas a 37°C com agitação a 180 rpm até atingir o valor de DO₆₀₀ de 0,8. No caso da estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 foi adicionada tetraciclina para uma concentração final de 75 ng/mL quando o valor de DO₆₀₀ atingiu os 0,5 [17, 129].

2.2.10.1 Ensaios de acumulação de brometo de etídio

Para a preparação do inóculo procedeu-se à recolha das células por centrifugação a 3.500 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente, e realizaram-se duas lavagens das células com PBS. Ao sedimento formado juntou-se PBS até a suspensão atingir a DO₆₀₀ de 0,8.

Cada mistura de reacção corresponde a uma concentração diferente de EtBr, com 50 µL de solução deste composto e 50 µL de suspensão de células. Foram realizados dois

ensaios em paralelo, com e sem glucose a 0,4% (v/v). As concentrações de EtBr testadas foram as seguintes: 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,125 µg/mL.

Os ensaios de acumulação foram realizados a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr efectuada após cada ciclo de 60 segundos, durante aproximadamente 60 minutos. Este ensaio permite definir qual a concentração basal de EtBr que deve ser usada nos ensaios de acumulação com os compostos inibidores de efluxo.

2.2.10.2 Ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença de inibidores de efluxo

Para a preparação do inóculo procedeu-se à recolha das células por centrifugação a 3.500 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente, e realizaram-se duas lavagens das células com PBS. Ao sedimento formado juntou-se PBS até a suspensão atingir a DO₆₀₀ de 0,8.

Cada mistura de reacção contém 50 µL de solução dos diferentes compostos com EtBr a 0,25 µg/mL (para ambas as estirpes) e 50 µL de suspensão de células. Foram realizados dois ensaios em paralelo, um com e outro sem glucose a 0,4% (v/v). Os inibidores de efluxo testados para ambas as estirpes e respectivas concentrações (1/2 ou abaixo do seu valor de CMI) foram os seguintes: tioridazina (15 µg/mL), verapamil (400 µg/mL), clorpromazina (30 µg/mL), flupentixol (30 µg/mL), haloperidol (128 µg/mL) NMP (128 µg/mL) e CCCP (16 µg/mL).

Os ensaios de acumulação foram realizados a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr efectuada após cada ciclo de 60 segundos, durante aproximadamente 60 minutos. Este ensaio permite determinar qual o composto que apresenta maior eficácia na inibição da actividade de efluxo das células.

2.2.10.3 Ensaios de efluxo

No caso dos ensaios de efluxo a preparação do inóculo difere relativamente aos ensaios de acumulação. Após lavagem das células da cultura, o sedimento formado foi ressuspensionado em PBS até atingir a DO₆₀₀ de 0,4 e incubou-se a suspensão durante 1 hora

com verapamil a 400 µg/mL (bloqueador de efluxo mais eficiente e a 1/2 do valor da sua CMI para ambas as estirpes) e de EtBr a 0,25 µg/mL (para ambas as estirpes), num tubo de vidro protegido da luz. Terminado este período, as células foram lavadas para a remoção do inibidor e ressuspensas em PBS.

Cada mistura de reacção contém 50 µL de solução do composto (sem EtBr) e 50 µL de suspensão de células. Foram realizados dois ensaios em paralelo, com e sem glucose a 0,4% (v/v). Os inibidores testados encontram-se em cada mistura de reacção a 1/2 da CMI para cada estirpe. Os inibidores testados e concentrações foram os seguintes: tioridazina (15 µg/mL), verapamil (400 µg/mL) e clorpromazina (30 µg/mL).

Os ensaios de efluxo foram realizados a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr efectuada após cada ciclo de 30 segundos (excepto o primeiro de 15 segundos), durante aproximadamente 30 minutos. Este ensaio permite observar o efluxo de EtBr pelas células quando é removida a inibição por um composto capaz de bloquear o efluxo. Foi realizado um controlo da suspensão celular com PBS para avaliar o efluxo basal das células.

2.2.11 Determinação da actividade enzimática da proteína NDH -2 de *M. tuberculosis* em suspensões membranares

2.2.11.1 Expressão e purificação da proteína NDH-2

A proteína NDH-2 foi sobre-expressa na estirpe *M. smegmatis* pMind:ndh-2, cujo gene está clonado no plasmídeo pMind, indutível à tetraciclina [132]. Foi efectuado um crescimento em paralelo da estirpe *M. smegmatis* mc²155. Ambas as estirpes foram inoculadas em meio 7H9, num volume final de 500 mL, a 37°C com agitação a 180 rpm. As células de *M. smegmatis* mc²155 foram recolhidas quando a cultura atingiu o final da fase estacionária (DO₆₀₀ de 1,6). No caso da estirpe transformada foi adicionada tetraciclina quando as culturas atingiram uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5 e incubou-se durante 24 horas [17, 129]. Foram testadas várias concentrações de tetraciclina, nomeadamente 20 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL e 250 ng/mL. A concentração 75 ng/mL foi a escolhida uma vez que foi a partir da qual se obtiveram maiores rendimentos na sobre-expressão. As células foram recolhidas por centrifugação (6.400xg

durante 10 minutos), ressuspendidas em 50 mL de tampão HEPES/fosfato e armazenadas a -80°C até à sua posterior utilização [132].

O protocolo de purificação da proteína NDH-2 em ambas as estirpes foi efectuado segundo o procedimento descrito por Yano *et al.* [132] com ligeiras alterações. As células previamente recolhidas foram lisadas por sonicação em gelo com um homogenizador Labsonic® M “homogenizer” (Sartorius, EUA). Foram efectuados seis ciclos de pulso 80% com duração de 3 minutos espaçados por intervalos de 1,5 minutos. De seguida, a suspensão foi centrifugada a 6.400xg durante 10 minutos (centrífuga 5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi ultracentrifugado (Optima LE-80, Beckman) a 22.500xg durante 1 hora (1ª ultracentrifugação). O sedimento obtido foi ressuspendido em tampão HEPES/fosfato e ultracentrifugado nas mesmas condições (2ª ultracentrifugação). Ao sedimento obtido foram adicionados os detergentes desoxicolato e colato de sódio (Alfa Aesar, Alemanha) para uma concentração final de 2% (p/v) e a suspensão resultante foi incubada em gelo durante 1 hora com agitação suave. O extracto proteico foi obtido por ultracentrifugação a 22.500xg durante 1 hora a 4°C (3ª ultracentrifugação).

De seguida, foi realizada uma cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC – “immobilized metal ion affinity chromatography”). Foi utilizada uma coluna de afinidade HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare) carregada com catiões de níquel conectada a um sistema ÄKTA prime plus (Amersham Biosciences). A coluna foi previamente equilibrada com tampão HEPES/fosfato contendo 1% (p/v) de colato de sódio. Após introdução e adsorção da amostra, a coluna foi novamente lavada com 20 mL de tampão seguido de 40 mL de tampão contendo 1% (p/v) de colato de sódio e 10 mM de imidazol (Alfa Aesar) para eliminar proteínas contaminantes. Para eluir a proteína NDH-2 utilizou-se tampão HEPES/fosfato com 1% (p/v) de colato de sódio e 150 mM de imidazol. Durante toda a operação manteve-se um fluxo constante de 1,0 mL/min. O processo de eluição foi monitorizado pelo registo de absorvância a 280 nm.

Na Figura 7 podemos observar uma representação esquemática dos diversos passos experimentais do protocolo de purificação da proteína NDH-2.

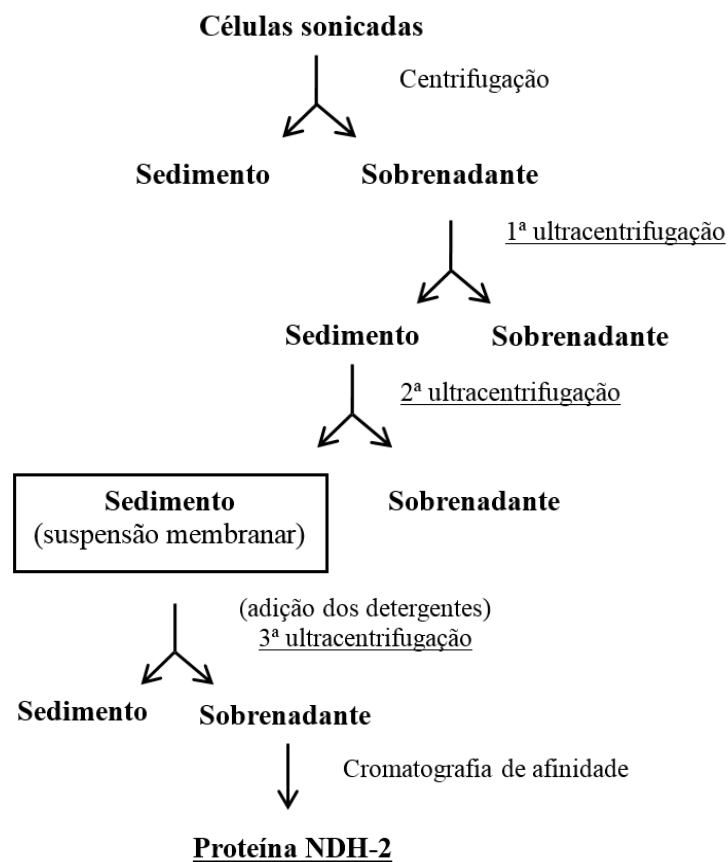


Figura 7 – Representação esquemática do protocolo de purificação da proteína NDH-2 [132]).

Foram recolhidas alíquotas dos vários passos do processo para monitorização da eficácia dos vários passos de purificação por electroforese SDS-PAGE. Esta foi efectuada em géis Amersham ECL 4-12% num sistema Amersham ECL Gel Box (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram previamente incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente em tampão de aplicação contendo SDS e β -mercaptoetanol e, de seguida, centrifugadas antes da aplicação nos géis. Os géis foram posteriormente corados com azul brilhante de Coomassie (Merck) para permitir a visualização das proteínas [47, 104].

2.2.11.2 Quantificação da proteína total

O doseamento da proteína total foi efectuado a partir do sedimento obtido na segunda ultracentrifugação do protocolo de purificação, correspondente às suspensões membranares (Figura 7). Esta quantificação foi efectuada através do método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando-se para o efeito o sistema Pierce® BCA “protein assay kit” (Thermo Scientific) com a albumina de soro bovino (BSA) como padrão de acordo com as instruções do fabricante [95]. A gama de concentrações abrangida encontra-se dentro do intervalo de 20 a 2000 µg/mL. Este método baseia-se na capacidade de redução do ião Cu^{2+} a Cu^{+} , em meio alcalino, pelas proteínas (reacção do biureto) e na detecção colorimétrica do ião Cu^{+} através de um reagente que contém BCA. O produto formado, de coloração púrpura e cuja intensidade é proporcional à sua concentração, é detectado por espectrofotometria de UV-visível a 562 nm. Na leitura das absorvâncias foram usadas “cuvettes” de quartzo com 1 cm de percurso óptico (Hellma, Alemanha) num espectrofotómetro Ultrospec 2100pro (Amersham Biosciences). Os ensaios de determinação da concentração da proteína total foram efectuados em duplicado e a média das absorvâncias obtidas em cada um dos replicados corrigidas para o valor da absorvância do branco do ensaio.

2.2.11.3 Ensaios enzimáticos

Para avaliar a actividade enzimática da proteína NDH-2 em suspensões membranares de *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:ndh-2 foram realizados ensaios de oxidação de NADH na presença de menaquinona como aceitador de electrões (Figura 8).

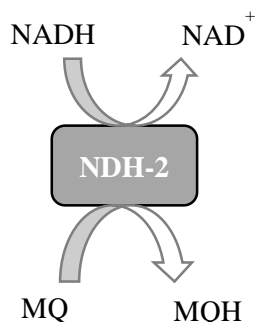


Figura 8 – Representação esquemática da reacção catalisada pela proteína NDH-2 (adaptado de Balde *et al.* [11]).

A oxidação de NADH foi seguida através da leitura da absorvância ao comprimento de onda de 340 nm num espectrofotómetro Ultrospec 2100pro, em cuvette de quartzo com 1 cm de percurso óptico (Hellma). Foi efectuada a optimização dos ensaios através do estudo da variação da concentração das suspensões membranares, do dador de electrões (NADH), do aceitador de electrões (menaquinona), tempos de incubação, duração do ensaio e alteração da ordem de adição dos reagentes. Após determinação das condições óptimas e de acordo com o método descrito por Weinstein *et al.* [127], os ensaios foram realizados à temperatura ambiente num volume final de 1,4 mL, com a adição dos reagentes pela seguinte ordem: tampão HEPES/fosfato, KCN (concentração final de 10 mM), menaquinona (50 μ M), suspensão membranares (70 μ g/mL). Esta mistura foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente e a reacção foi iniciada com a adição de NADH (100 μ M). Os ensaios de referência foram realizados de igual modo, mas sem a adição da suspensão membranares.

A actividade enzimática foi calculada a partir do número de moles de NADH oxidado por minuto e por miligrama de proteína total e um valor para o coeficiente de absorptividade molar do NADH a 340 nm de 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [36].

Foi também estudado o efeito de vários inibidores de efluxo na actividade enzimática da proteína NDH-2 nas suspensões membranares de *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*. De entre os inibidores de efluxo estudados, foram seleccionados para estes ensaios a tioridazina, clorpromazina, verapamil, flupentixol e haloperidol. Nestes ensaios o procedimento experimental utilizado foi semelhante ao descrito, sendo os inibidores adicionados antes da suspensão membranares. As concentrações dos inibidores testados foram baseadas no valor de CMI obtido para a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*, tendo variado entre 1/8 e 3 vezes.

3. RESULTADOS

3.1 Clonagem do gene *ndh-2*

3.1.1 Amplificação do gene *ndh-2* de *M. tuberculosis* H37Rv

Para a amplificação do gene *ndh-2* foi realizada uma reacção de PCR utilizando como molde DNA da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv, que corresponde à estirpe de referência [132]. O gene tem o tamanho de 1.392 pb [107] e para a sua amplificação foi usado o par de “primers” *ndh_fw* e *ndh_rv*, em que o “primer” *ndh_rv* codifica para uma cauda de histidinas, importante para passos de purificação proteica posteriores. O fragmento de DNA amplificado, ou seja, o gene com a cauda de histidinas, perfaz 1.410 pb. No final da reacção de PCR, o produto de amplificação foi purificado. A presença e tamanho do fragmento amplificado foram verificados por electroforese em gel de agarose (Figura 9).

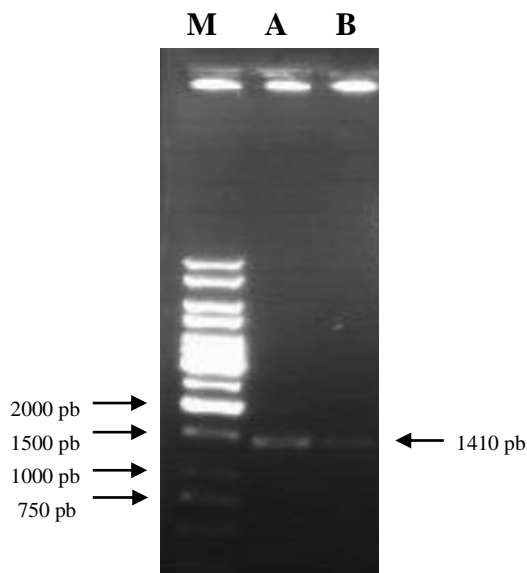


Figura 9 – Electroforese em gel de agarose a 0,7% (p/v) dos produtos de amplificação do gene *ndh-2*, antes e após purificação. M: Marcador 1 kb DNA “Ladder Gene Ruler”; **A:** produto da reacção de amplificação por PCR do gene *ndh-2*; **B:** produto purificado da reacção de amplificação por PCR do gene *ndh-2*.

3.1.2 Obtenção do plasmídeo pMind

O plasmídeo pMind foi obtido a partir da estirpe *E. coli* JOV MM140:pMind e linearizado com a enzima de restrição *Bam*HI. Os produtos foram analisados por electroforese, verificando-se uma banda do tamanho esperado, cerca de 6,8 kb, já que o plasmídeo tem 6.849 pb [17]. Como se pode verificar na Figura 10, a reacção de restrição de pMind foi eficaz, e pela posição da banda do produto da linearização, o plasmídeo apresenta o tamanho esperado.

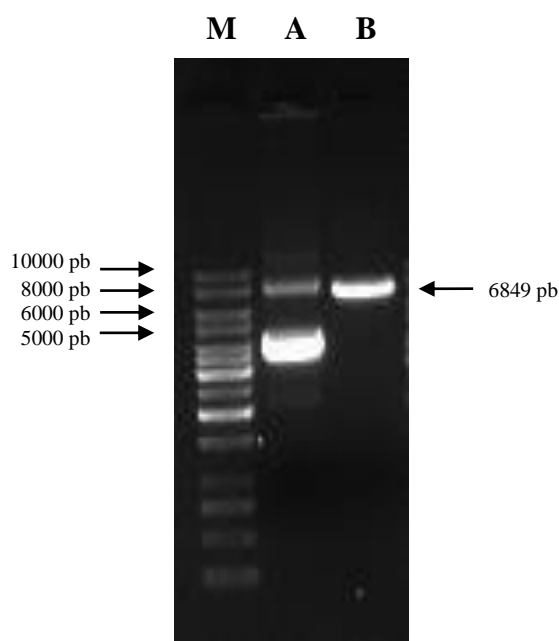


Figura 10 – Electroforese em gel de agarose a 0,7% (p/v) do produto da extracção plasmídica e da linearização do plasmídeo. M: Marcador 1 kb DNA “Ladder Gene Ruler”; A: plasmídeo pMind; B: plasmídeo pMind linearizado com a enzima de restrição *Bam*HI.

3.1.3 Transformação do plasmídeo pMind:*ndh-2*

3.1.3.1 Transformação de *E. coli* com o plasmídeo pMind:*ndh-2*

O produto de ligação pMind:*ndh-2* foi introduzido em células competentes de *E. coli* DH5 α por transformação. Os controlos de viabilidade das células, de antibiótico e de esterilidade do meio de cultura foram validados. Foram obtidas várias colónias no meio de selecção, das quais foram seleccionadas oito para inoculação em meio líquido. Das oito culturas preparadas, verificou-se crescimento em seis (denominadas por colónia n.º

1, 2, 5, 6, 7, 8). Foi realizado o protocolo de extracção de DNA plasmídico, seguido da reacção de linearização dos plasmídeos com a enzima de restrição *Bam*HI. O tamanho esperado para a sequência de ligação entre o plasmídeo pMind e o gene *ndh-2* é de 8.259 pb. Os produtos de restrição foram analisados por electroforese em gel de agarose (Figura 11). Pela análise da posição das bandas no gel, os transformantes n.º 2, 5 e 8 deverão conter o produto de ligação.

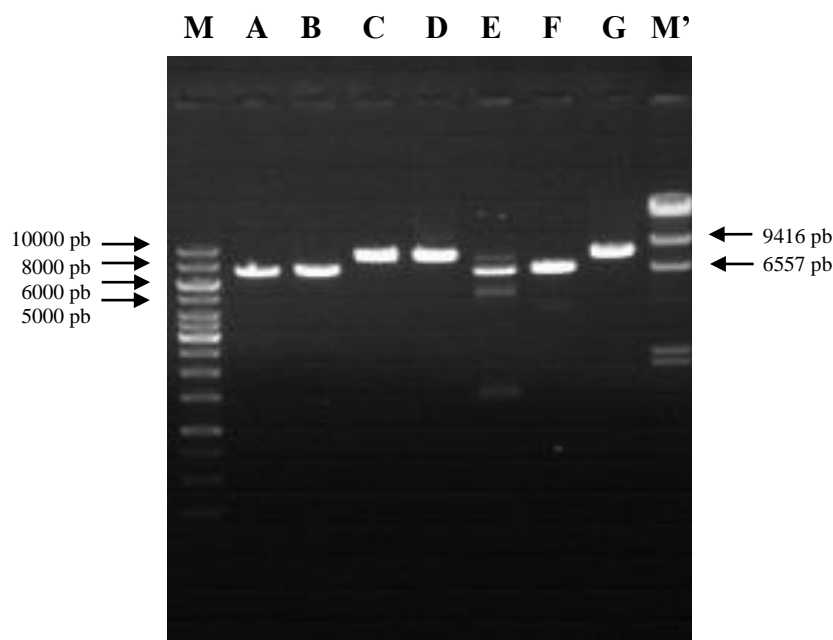


Figura 11 – Electroforese em gel de agarose a 0,7% (p/v) dos plasmídeos extraídos das culturas de *E. coli* transformadas com o produto de ligação pMind:*ndh-2*. M: Marcador 1 kb DNA “Ladder Gene Ruler”; A: plasmídeo pMind linearizado; B: plasmídeo linearizado da colónia de *E. coli* transformante n.º 1; C: plasmídeo linearizado da colónia n.º 2; D: plasmídeo linearizado da colónia n.º 5; E: plasmídeo linearizado da colónia n.º 6; F: plasmídeo linearizado da colónia n.º 7; G: plasmídeo linearizado da colónia n.º 8; M’: Marcador DNA λ HindIII.

3.1.3.2 Electrotransformação de *M. smegmatis* mc²155 com o plasmídeo pMind:*ndh-2*

O produto de ligação pMind:*ndh-2* foi introduzido na estirpe de *M. smegmatis* mc²155 por electroporação para estudos posteriores. Após a electrotransformação, foram obtidas dez colónias transformantes, nas diluições de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, e feita a sua passagem para meio líquido.

A partir das culturas obtidas em meio líquido, foi feita a extracção de DNA plasmídico, seguida da linearização com a enzima de restrição *Bam*HI. Os produtos foram observados numa electroforese em gel de agarose (Figura 12). Pela análise da posição das

bandas no gel, as colónias transformantes n.º 2, 3, 5, 7, 9 e 10 contêm o produto de ligação. Para confirmação da correcta clonagem do gene *ndh-2* em pMind, foi realizada a sequenciação da amostra de DNA do transformante n.º 2. Assim, as células transformantes n.º 2 foram designadas de *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* e foram usadas para a realização do trabalho experimental posterior.

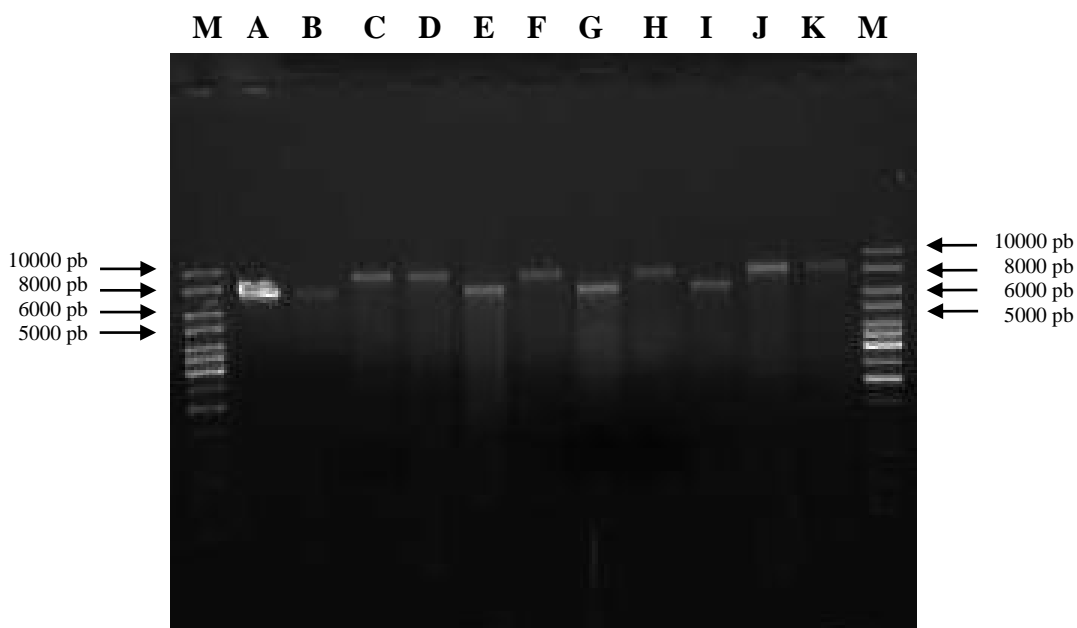


Figura 12 – Electroforese em gel de agarose a 0,7% (p/v) dos plasmídeos extraídos da estirpe de *M. smegmatis* mc²155 após electrotransformação com o produto de ligação de pMind com *ndh-2*. M: Marcador 1 kb DNA “Ladder Gene Ruler”; A: plasmídeo pMind linearizado; B: plasmídeo linearizado da colónia de *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* n.º 1; C: plasmídeo linearizado da colónia n.º 2; D: plasmídeo linearizado da colónia n.º 3; E: plasmídeo linearizado da colónia n.º 4; F: plasmídeo linearizado da colónia n.º 5; G: plasmídeo linearizado da colónia n.º 6; H: plasmídeo linearizado da colónia n.º 7; I: plasmídeo linearizado da colónia n.º 8; J: plasmídeo linearizado da colónia n.º 9; K: plasmídeo linearizado da colónia n.º 10.

3.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*

Neste trabalho foram determinadas as CMIs de antibióticos, inibidores de efluxo e de antibióticos na presença desses mesmos inibidores para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*.

3.2.1 Determinação de CMIs de antibióticos

Os valores de CMIs de um conjunto de onze antibióticos e do brometo de etídio foram determinados para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 (Tabela 7). Os resultados de CMIs dos antibióticos e brometo de etídio serão importantes para perceber se existe alguma diferença na susceptibilidade aos compostos entre as estirpes original e transformada com o gene *ndh*-2, bem como para interpretar os ensaios de avaliação da actividade de efluxo e enzimática.

Tabela 7 – Resultados da determinação de CMIs de diferentes antibióticos e brometo de etídio para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh*-2.

Compostos	CMI (µg/mL)	
	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh</i> -2
Antibióticos		
INH	16	16
RIF	64	32
EMB	2	2
CLA	8	16
ERY	256	256
OFX	0,5	0,5
KAN	4	>1024
AMK	1	16
GET	4	4
CAP	4	4
TET	2	2
Outros compostos		
EtBr	12	12

CMI: concentração mínima inibitória; **INH:** isoniazida; **RIF:** rifampicina; **EMB:** etambutol; **CLA:** claritromicina; **ERY:** eritromicina; **OFX:** ofloxacina; **KAN:** canamicina; **AMK:** amicacina; **GET:** gentamicina; **CAP:** capreomicina; **TET:** tetraciclina; **EtBr:** brometo de etídio. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Como se pode verificar na Tabela 7, as diferenças existentes entre as duas estirpes avaliadas são de apenas um factor de diluição, excepto para a canamicina e a amicacina. Para a estirpe *M. smegmatis* mc²155, o valor da CMI da rifampicina e da claritromicina foi de 64 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente, enquanto para a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 foram registados valores de 32 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. No caso da canamicina, a estirpe transformada apresenta uma CMI (>1024 µg/mL) bastante superior à da estirpe original (4 µg/mL), o que era esperado uma vez que a estirpe

transformada possui o plasmídeo pMind que contém um gene que confere resistência a este antibiótico. Esta estirpe apresenta também um valor de CMI mais elevado para a amicacina, o que mais uma vez era esperado, dado tratar-se de um derivado químico da canamicina pertencente à mesma classe (aminoglicosídeos), o que origina resistência também a este antibiótico [41]. Para além dos antibióticos, foi determinada a CMI do brometo de etídio, tendo-se obtido a mesma CMI para as duas estirpes, 12 µg/mL.

3.2.2 Determinação de CMIs de inibidores de efluxo

Os valores de CMIs de um conjunto de oito compostos descritos como inibidores de efluxo foram determinados para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* (Tabela 8). Os resultados de CMI para os inibidores de efluxo serão igualmente importantes para a realização e interpretação dos ensaios de avaliação da actividade de efluxo e da actividade enzimática.

Tabela 8 – Resultados da determinação de CMIs de diferentes inibidores de efluxo para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh-2*.

Inibidores	CMI (µg/mL)	
	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh-2</i>
TZ	30	30
VP	800	800
CPZ	60	60
FPX	60	60
HAL	256	256
ORT	> 2048	> 2048
NMP	512	512
CCCP	32	32

CMI: concentração mínima inibitória; TZ: tioridazina; VP: verapamil; CPZ: clorpromazina; FPX: flupentixol; HAL: haloperidol; ORT: ortovanadato; NMP: 1-(1-naftilmetil)piperazina; CCCP: carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Como se pode verificar pelos dados apresentados na Tabela 8, não existem diferenças para os valores de CMI dos inibidores de efluxo testados para as duas estirpes.

3.2.3 Determinação de CMI de antibióticos na presença de inibidores de efluxo

Foram determinados os valores de CMI de antibióticos e brometo de etídio para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 na presença de inibidores de efluxo (Tabela 9). Estes resultados permitiram avaliar qual o efeito de cada um dos inibidores no valor da CMI para cada antibiótico e verificar possíveis diferenças entre as estirpes. Os resultados do brometo de etídio irão permitir uma comparação com os ensaios de actividade de efluxo realizados posteriormente (ponto 3.3).

Tabela 9 – Resultados da determinação da CMI de antibióticos e brometo de etídio na presença de inibidores de efluxo para a estirpe *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh*-2.

Composto	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155		<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh</i> -2	
	CMI (µg/mL)	Efeito inibitório	CMI (µg/mL)	Efeito inibitório
INH	16		16	
+TZ	16	-	16	-
+VP	16	-	8	2
+CPZ	16	-	8	2
+FPX	16	-	16	-
+HAL	8	2	8	2
+ORT	16	-	16	-
+NMP	16	-	8	2
+CCCP	8	2	8	2
RIF	64		32	
+TZ	16	4	16	2
+VP	16	4	16	2
+CPZ	16	4	16	2
+FPX	8	8	8	4
+HAL	4	16	8	4
+ORT	32	2	32	-
+NMP	32	2	32	-
+CCCP	16	4	32	-
EMB	2		2	
+TZ	2	-	2	-
+VP	2	-	2	-
+CPZ	2	-	2	-
+FPX	2	-	2	-
+HAL	2	-	2	-
+ORT	1	2	1	2
+NMP	2	-	2	-
+CCCP	2	-	1	2

Tabela 9 (cont.)

Composto	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155		<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh</i> -2	
	CMI (µg/mL)	Efeito inibitório	CMI (µg/mL)	Efeito inibitório
CLA	8		16	
+TZ	1	8	2	8
+VP	2	4	2	8
+CPZ	1	8	2	8
+FPX	0,25	32	1	16
+HAL	0,25	32	2	8
+ORT	2	4	2	8
+NMP	8	-	4	4
+CCCP	2	4	2	8
ERY	256		256	
+TZ	64	4	256	-
+VP	128	2	64	4
+CPZ	64	4	64	4
+FPX	16	16	64	4
+HAL	16	16	32	8
+ORT	128	2	128	2
+NMP	256	-	32	8
+CCCP	128	2	256	-
OFX	0,5		0,5	
+TZ	0,5	-	0,5	-
+VP	0,5	-	0,5	-
+CPZ	0,5	-	0,5	-
+FPX	0,5	-	0,5	-
+HAL	0,25	2	0,5	-
+ORT	0,5	-	0,5	-
+NMP	0,5	-	0,5	-
+CCCP	0,5	-	0,5	-
AMK	1		16	
+TZ	0,25	4	16	-
+VP	0,5	2	8	2
+CPZ	0,5	2	8	2
+FPX	0,25	4	8	2
+HAL	0,25	4	4	4
+ORT	0,125	8	16	-
+NMP	0,125	8	2	8
+CCCP	1	-	8	2
GET	4		4	
+TZ	1	4	2	2
+VP	1	4	2	2
+CPZ	1	4	2	2
+FPX	2	2	2	2
+HAL	0,5	8	1	4
+ORT	2	2	1	4
+NMP	0,5	8	1	4
+CCCP	0,5	8	4	-

Tabela 9 (cont.)

Composto	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155		<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind:ndh-2	
	CMI (µg/mL)	Efeito inibitório	CMI (µg/mL)	Efeito inibitório
CAP	4		4	
+TZ	2	2	2	2
+VP	1	4	2	2
+CPZ	2	2	2	2
+FPX	2	2	2	2
+HAL	1	4	2	2
+ORT	2	2	2	2
+NMP	1	4	2	2
+CCCP	1	4	4	-
TET	2		2	
+TZ	0,25	8	0,125	16
+VP	0,25	8	0,25	8
+CPZ	0,5	4	0,25	8
+FPX	0,5	4	0,25	8
+HAL	0,5	4	0,25	8
+ORT	1	2	2	-
+NMP	1	2	0,25	8
+CCCP	1	2	0,25	8
EtBr	12		12	
+TZ	6	2	3	4
+VP	0,75	16	0,75	16
+CPZ	6	2	6	2
+FPX	6	2	6	2
+HAL	0,375	32	0,1875	64
+ORT	6	2	6	2
+NMP	3	4	3	4
+CCCP	3	4	1,5	8

INH: isoniazida; **RIF:** rifampicina; **EMB:** etambutol; **CLA:** claritromicina; **ERY:** eritromicina; **OFX:** ofloxacina; **AMK:** amikacina; **GET:** gentamicina; **CAP:** capreomicina; **TET:** tetraciclina; **EtBr:** brometo de etídio; **TZ:** tioridazina (7,5 µg/mL); **VP:** verapamil (200 µg/mL); **CPZ:** clorpromazina (15 µg/mL); **FPX:** flupentixol (15 µg/mL); **HAL:** haloperidol (64 µg/mL); **ORT:** ortovanadato (1024 µg/mL); **NMP:** 1-(1-naftilmetil)piperazina (128 µg/mL); **CCCP:** carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (8 µg/mL). (-) Sem efeito inibitório. Os valores a negrito correspondem àqueles em que ocorreu uma diminuição de CMI para pelo menos um quarto do seu valor original [81]. Os inibidores de efluxo foram utilizados a um quarto (ou abaixo) do seu valor de CMI para cada estirpe. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Em relação aos resultados obtidos apresentados na Tabela 9, para ambas as estirpes observa-se uma diminuição dos valores de CMI de alguns dos antibióticos testados e do brometo de etídio. É considerado efeito inibitório significativo quando ocorre uma diminuição igual ou superior a quatro vezes o valor de CMI dos antibióticos ou do brometo de etídio [81].

No caso da **rifampicina**, os compostos com efeito inibitório mais significativo na estirpe original foi o flupentixol e o haloperidol com reduções de 8 e 16 vezes o valor de

CMI sem inibidor, respectivamente, e a tioridazina, verapamil, clorpromazina e CCCP com reduções de 4 vezes. Na estirpe transformada, o flupentixol e o haloperidol diminuíram 4 vezes o valor de CMI da rifampicina.

Para a **claritromicina**, no caso da estirpe original o flupentixol e haloperidol diminuíram 32 vezes o valor de CMI, a tioridazina e clorpromazina 8 vezes e o verapamil, ortovanadato e CCCP 4 vezes. Na estirpe transformada, o flupentixol provocou uma diminuição de 16 vezes do valor de CMI da claritromicina, enquanto a tioridazina, verapamil, clorpromazina, haloperidol, ortovanadato e CCCP 8 vezes, e NMP 4 vezes.

Para a **eritromicina**, na estirpe original o flupentixol e haloperidol reduziram 16 vezes o valor de CMI, enquanto a tioridazina e a clorpromazina 4 vezes. Para a estirpe transformada o haloperidol e NMP provocaram uma diminuição de 8 vezes, e o verapamil, clorpromazina e flupentixol uma diminuição de 4 vezes.

No caso da **amicacina**, para a estirpe original o ortovanadato e a NMP provocaram uma diminuição de 8 vezes em relação à CMI sem inibidores, enquanto a tioridazina, flupentixol e haloperidol provocaram uma diminuição de 4 vezes. Para a estirpe transformada, a NMP e o haloperidol reduziram 4 e 8 vezes, respectivamente, o valor de CMI.

Para a **gentamicina** na estirpe original registaram-se reduções de 8 vezes o valor de CMI com o haloperidol, NMP e CCCP, e de 4 vezes com a tioridazina, verapamil e clorpromazina. Na estirpe transformada o valor de CMI da gentamicina reduziu 4 vezes com o haloperidol, ortovanadato e NMP.

No caso da **capreomicina** registou-se efeito inibitório significativo apenas na estirpe original, nomeadamente para o verapamil, haloperidol, NMP e CCCP, com uma redução de 4 vezes o valor inicial de CMI.

Para a **tetraciclina**, na estirpe original ocorreram reduções do valor de CMI de 8 vezes com a tioridazina e verapamil, e 4 vezes com a clorpromazina, flupentixol e haloperidol. No caso estirpe transformada, houve uma redução de 16 vezes do valor de CMI com a tioridazina, 8 vezes com o verapamil, clorpromazina, flupentixol, haloperidol, NMP e CCCP.

Relativamente à **isoniazida**, **etambutol** e **ofloxacina**, não se verificou efeito inibitório significativo com nenhum dos compostos testados.

Por fim, para o **brometo de etídio**, na estirpe original o valor de CMI reduziu 32 vezes com o haloperidol, 16 vezes com o verapamil e 4 vezes com a NMP e CCCP. Para a estirpe transformada, o valor de CMI reduziu 64 vezes com o haloperidol, 16 vezes com o verapamil, 8 vezes com o CCCP e 4 vezes com a tioridazina e a NMP.

Com base nestes resultados, os inibidores de efluxo mais eficazes para ambas as estirpes foram o haloperidol, flupentixol e verapamil. No geral, a claritromicina, eritromicina e rifampicina foram os antibióticos com maior redução do valor de CMI na presença dos inibidores de efluxo. Em particular para a estirpe transformada, *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*, os casos em que se verificaram maiores efeitos foram: claritromicina com flupentixol; eritromicina com haloperidol e NMP; tetraciclina com tioridazina; e brometo de etídio com haloperidol e verapamil.

3.3 Avaliação da actividade de efluxo em tempo real

Para a avaliação da actividade de efluxo das células foi utilizado um método fluorométrico semi-automático que permite monitorizar o transporte do brometo de etídio, um substrato da maioria das bombas de efluxo, através da fluorescência emitida por este composto.

3.3.1 Ensaios de acumulação de brometo de etídio

Os ensaios de acumulação de brometo de etídio das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* permitiram determinar qual a concentração basal que permite um equilíbrio entre o influxo e o efluxo deste substrato. Esta concentração será a utilizada nos ensaios seguintes para avaliar a influência de diversos factores na actividade de efluxo, e é geralmente definida como aquela que não ultrapasse as 10 unidades arbitrárias de fluorescência.

Nas Figuras 13 e 14 estão representados os gráficos dos ensaios de acumulação de brometo de etídio para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*, respectivamente, na ausência ou presença de glucose. Como se pode verificar pela análise destes gráficos para ambas estirpes, na presença de glucose ocorre menor

acumulação de EtBr no interior das células. A concentração basal de EtBr estabelecida foi de 0,25 µg/mL para as duas estirpes.

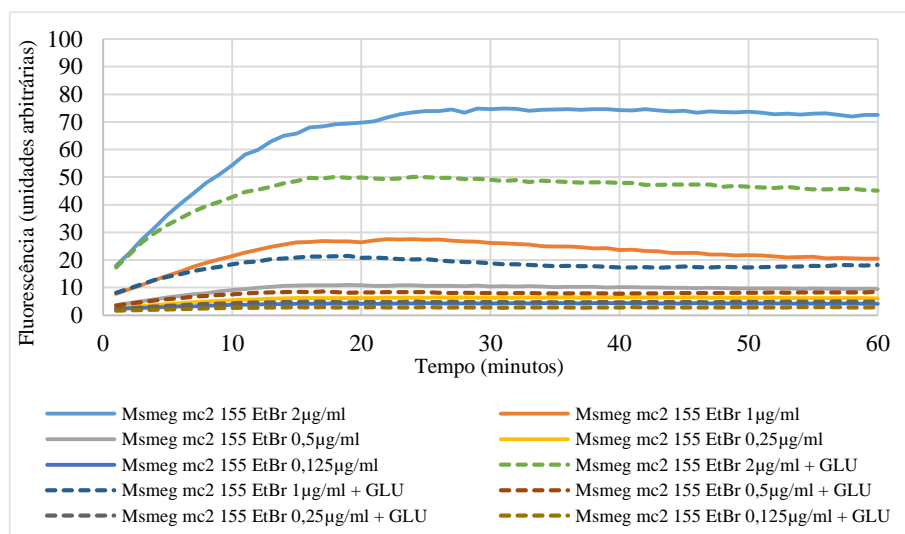


Figura 13 – Gráfico do ensaio de acumulação da estirpe *M. smegmatis* mc²155 na presença de concentrações crescentes de EtBr. Foram realizados ensaios em paralelo com e sem glucose, a uma concentração de 0,4% para a mesma concentração de brometo de etídio. Os ensaios foram realizados em triplicado.

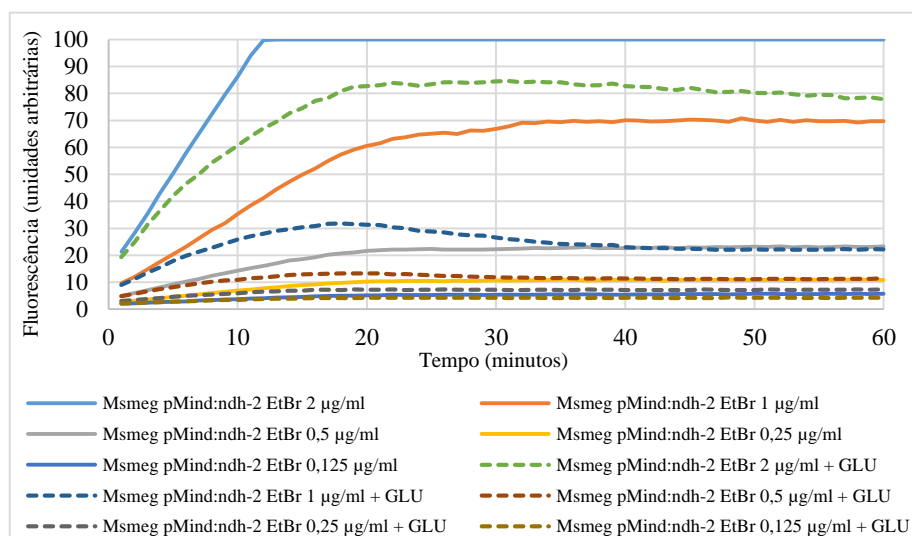


Figura 14 – Gráfico do ensaio de acumulação da estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:ndh-2 na presença de concentrações crescentes de EtBr. Foram realizados ensaios em paralelo com e sem glucose, a uma concentração de 0,4% para a mesma concentração de brometo de etídio. Os ensaios foram realizados em triplicado.

No caso da estirpe *M. smegmatis* pMind:ndh-2, quando incubada com 1 µg/ml de brometo de etídio na presença de glucose, verifica-se um decréscimo de fluorescência a partir dos 18 minutos (Figura 14), comportamento que foi reproduzido nas várias repetições deste ensaio e que deverá corresponder a uma maior capacidade por parte das células de efluxar brometo de etídeo nestas condições.

3.3.2 Ensaios de acumulação de brometo de etídio com inibidores de efluxo

Os ensaios de acumulação de brometo de etídio das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* na presença de inibidores de efluxo permitiram determinar qual o composto com maior efeito inibitório no efluxo de brometo de etídio nas condições destes ensaios. A concentração de EtBr a utilizar foi determinada nos ensaios de acumulação (ponto 3.3.1) e corresponde a 0,25 µg/mL para as duas estirpes. Foi realizado um ensaio de controlo, que corresponde à incubação das células com esta concentração de composto na ausência de inibidores de efluxo. A concentração de inibidor utilizada em cada ensaio corresponde a metade, ou menos, do valor da sua CMI, de forma a não comprometer a viabilidade celular.

Nas Figuras 15 e 16 estão representados os gráficos dos ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença de inibidores de efluxo para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*, respectivamente. O controlo realizado com 0,25 µg/mL de EtBr na ausência de inibidores apresentou fluorescência a nível basal, o que permite analisar os restantes resultados, garantindo que eventuais efeitos de acumulação serão devidas apenas ao inibidor e não à concentração de EtBr utilizada.

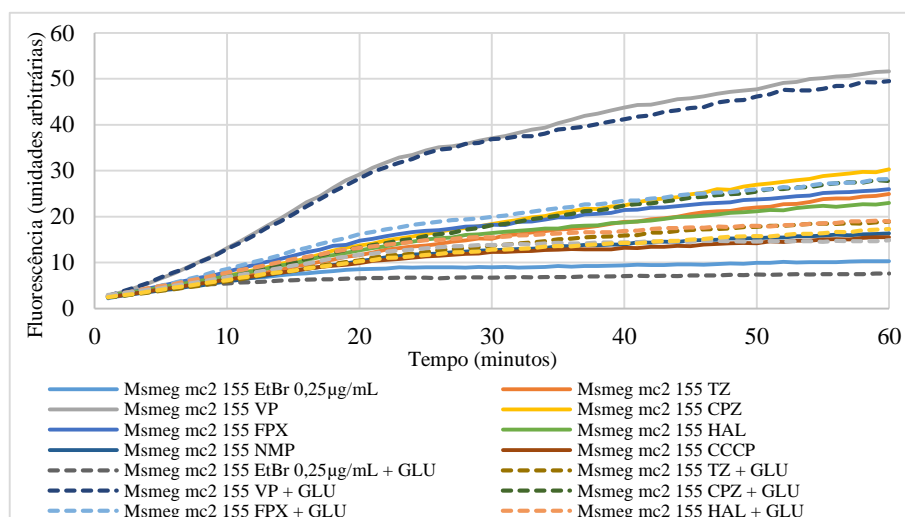


Figura 15 – Gráfico do ensaio de acumulação de EtBr a 0,25 µg/mL da estirpe *M. smegmatis* mc²155 na presença de inibidores de efluxo. As concentrações de inibidores de efluxo foram as seguintes: TZ a 15 µg/mL, VP a 400 µg/mL, CPZ a 30 µg/mL, FPX a 30 µg/mL, HAL a 128 µg/mL, NMP a 128 µg/mL e CCCP a 16 µg/mL. Foram realizados ensaios em paralelo com e sem glucose, a uma concentração de 0,4%, para o mesmo inibidor de efluxo. Os ensaios foram realizados em triplicado.

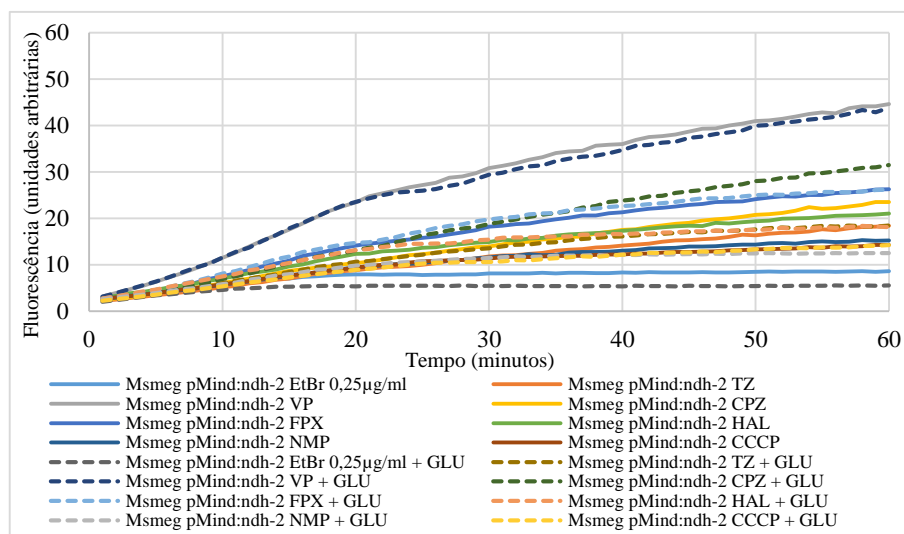


Figura 16 – Gráfico do ensaio de acumulação de EtBr a 0,25 µg/mL da estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:ndh-2 na presença de inibidores de efluxo. As concentrações de inibidores de efluxo foram as seguintes: TZ a 15 µg/mL, VP a 400 µg/mL, CPZ a 30 µg/mL, FPX a 30 µg/mL, HAL a 128 µg/mL, NMP a 128 µg/mL e CCCP a 16 µg/mL. Foram realizados ensaios em paralelo com e sem glucose, a uma concentração de 0,4%, para o mesmo inibidor de efluxo. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Como se pode verificar, o verapamil é o composto que apresenta maior efeito inibitório do efluxo, comparativamente com os restantes compostos, que não apresentam um efeito tão significativo. Na presença deste composto são detectados maiores níveis de fluorescência, o que implica maior acumulação de EtBr pelas células, ou seja, menor efluxo. Mais uma vez, apesar de forma menos significativa, verificamos que na presença de glucose as células apresentam menor fluorescência, mesmo na presença de inibidores de efluxo. Não são registadas diferenças significativas entre as duas estirpes.

3.3.3 Ensaios de efluxo

Os ensaios de efluxo das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:ndh-2 permitem avaliar a capacidade de efluxo das células em diferentes condições, incluindo a presença de diversos inibidores de efluxo. Neste caso, foram testados três compostos conhecidos como inibidores de efluxo, nomeadamente verapamil, tioridazina e clorpromazina, por comparação com o ensaio controlo, que corresponde às células sem inibidor (com e sem glucose).

Nas Figuras 17 e 18 estão representados os gráficos dos ensaios de efluxo para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:ndh-2, respectivamente. Estes

gráficos encontram-se normalizados para as condições de ausência de efluxo (células em PBS com verapamil, sem glucose).

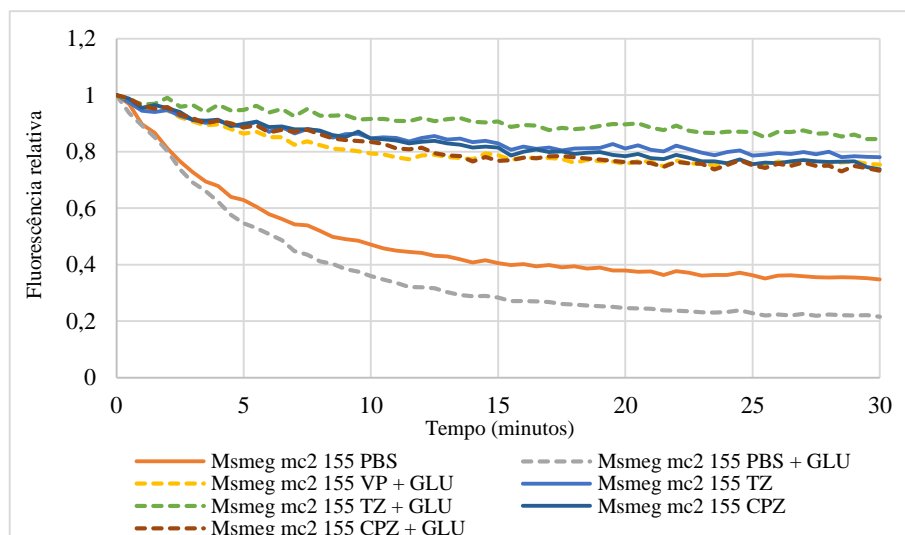


Figura 17 – Gráfico do ensaio de efluxo da estirpe *M. smegmatis* mc²155. As concentrações de inibidores de efluxo foram as seguintes: TZ a 15 µg/mL, VP a 400 µg/mL, CPZ a 30 µg/ mL. Foram realizados ensaios em paralelo com e sem glucose, a uma concentração de 0,4% para o mesmo inibidor de efluxo e controle. Os ensaios foram realizados em triplicado.

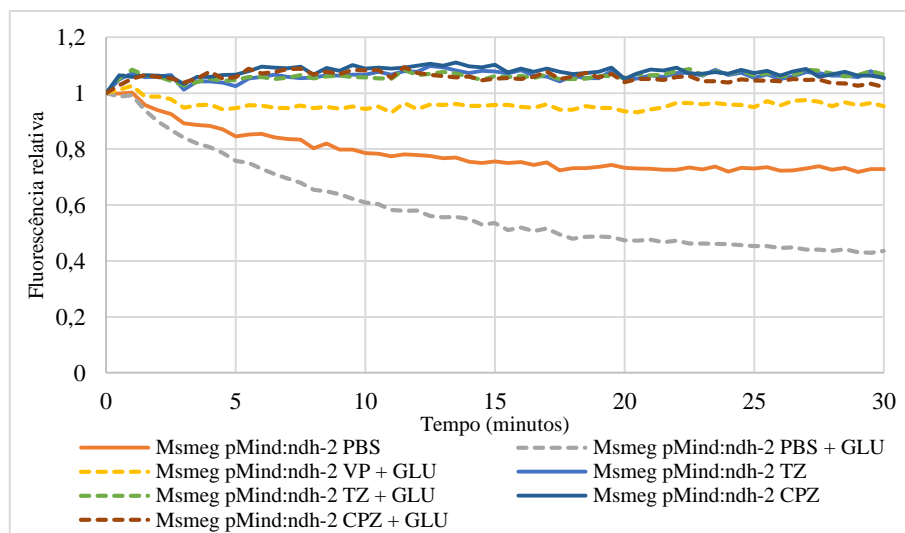


Figura 18 – Gráfico do ensaio de efluxo da estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:ndh-2. As concentrações de inibidores de efluxo foram as seguintes: TZ a 15 µg/mL, VP a 400 µg/mL, CPZ a 30 µg/ mL. Foram realizados ensaios em paralelo com e sem glucose, a uma concentração de 0,4% para o mesmo inibidor de efluxo e controle. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Comparando os ensaios de efluxo das duas estirpes, é possível observar maior actividade de efluxo para a estirpe *M. smegmatis* mc²155, actividade esta que é ligeiramente aumentada pela adição de glucose. Para a estirpe transformada, a adição de

glucose potencia a actividade de efluxo de uma forma mais visível. Para ambas as estirpes, verifica-se a eficácia dos inibidores (tioridazina, clorpromazina e verapamil) por comparação com o ensaio sem inibidor. No caso particular do verapamil, que foi usado para o controlo de ausência de efluxo, por ser aquele que apresenta maior capacidade inibitória, a adição de glucose praticamente não tem efeito no caso da estirpe transformada (Figura 18), enquanto se verifica um efeito, embora reduzido, na estirpe original (Figura 17).

3.4 Determinação da actividade da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* em suspensões membranares

3.4.1 Purificação da proteína NDH-2

Nos sedimentos obtidos após a primeira ultracentrifugação (Figura 7) observou-se uma coloração amarela reveladora da presença do cofactor FAD da enzima NDH-2 (Figura 19). A coloração mais intensa existente no sedimento da estirpe transformada indica a possível sobre-expressão da proteína pretendida.

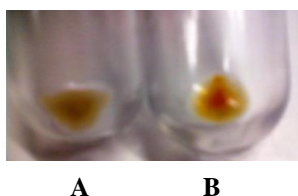


Figura 19 – Sedimentos obtidos após a 1ª ultracentrifugação. A: Sedimento da estirpe *M. smegmatis* mc²155; **B:** Sedimento da estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:ndh-2.

As várias amostras recolhidas ao longo dos passos de purificação foram avaliadas por electroforese SDS-PAGE (Figura 20).

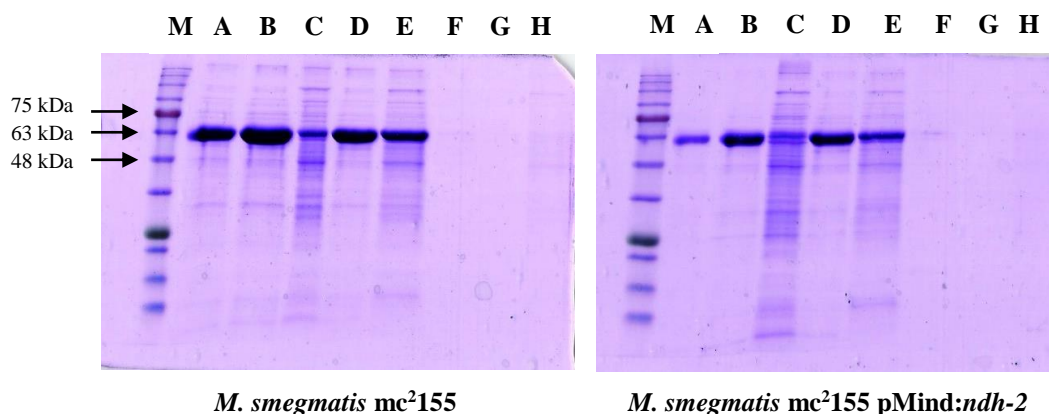


Figura 20 – Electroforese SDS-PAGE das alíquotas recolhidas ao longo de vários passos de purificação. M: NZYColour Protein Marker II, Nzytech; **A:** Suspensão de células sonicadas; **B:** Sobrenadante (centrifugação); **C:** Sedimento (centrifugação); **D:** Sobrenadante (1ª ultracentrifugação); **E:** Sedimento (1ª ultracentrifugação); **F:** Suspensão do sobrenadante com detergentes; **G:** Sobrenadante (3ª ultracentrifugação); **H:** Sedimento (3ª ultracentrifugação).

Na Figura 20 pode verificar-se, em ambas as estirpes, a presença de proteínas com massa molecular cerca de 50 kDa. Uma vez que os géis não foram normalizados, não é possível inferir acerca da ocorrência de sobre-expressão da proteína NDH-2 na estirpe transformada comparativamente à original. Nos últimos poços, as amostras aplicadas correspondem ao passo de adição de detergentes (extracção da proteína NDH-2), e verifica-se que as bandas são muito ténues, provavelmente devido a um elevado factor de diluição. Apesar da proteína NDH-2 ter sido expressa com uma cauda de histidinas de modo a facilitar o seu processo de purificação por cromatografia de afinidade, a análise das várias fracções obtidas não revelou quantidade apreciável de proteínas. Estes resultados podem dever-se à baixa concentração da proteína NDH-2 presente nas amostras, uma vez que o volume de cultura inicial utilizado nestes ensaios foi de 50 mL. No decurso deste trabalho foram efectuadas outras tentativas de purificação desta proteína, não tendo sido possível isolá-la até ao momento. De modo a permitir avançar com os estudos, foram efectuados ensaios em paralelo utilizando as suspensões membranares obtidas na 2ª ultracentrifugação. Estes resultados são apresentados nas secções seguintes.

3.4.2 Quantificação de proteína total nas suspensões membranares de *M. smegmatis*

A concentração de proteína total presente nas suspensões membranares das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 (Tabela 10) foi determinada a partir da curva de calibração apresentada na Figura 21.

Tabela 10 – Concentração de proteína total obtida para as suspensões membranares (15 mL) das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh*-2 provenientes de 500 mL de cultura.

Cultura	Absorvância				Concentração (µg/mL)
	1 ^a	2 ^a	Média	Corrigida	
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	0,473	0,491	0,482	0,366	298
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 pMind: <i>ndh</i> -2	1,015	1,059	1,037	0,920	777

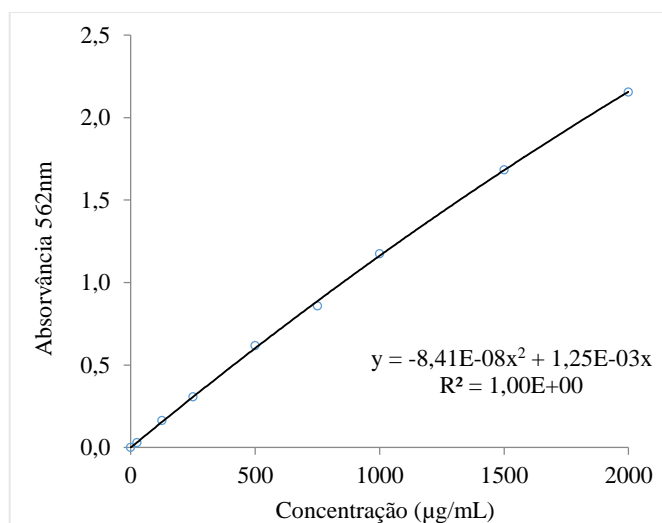


Figura 21 – Curva de calibração utilizada no doseamento da proteína total das suspensões membranares das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh*-2.

A diferença nos valores de concentração de proteína total entre as duas estirpes (Tabela 10) poderá reflectir a sobre-expressão de NDH-2 na estirpe transformada como esperado.

3.4.3 Comparação da actividade enzimática da proteína NDH-2 em suspensões membranares de *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*

A variação da absorvância a 340 nm com o tempo após a adição de NADH, referente aos ensaios de actividade enzimática efectuados com suspensões membranares das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* e ao ensaio controlo, encontra-se representada na Figura 22.

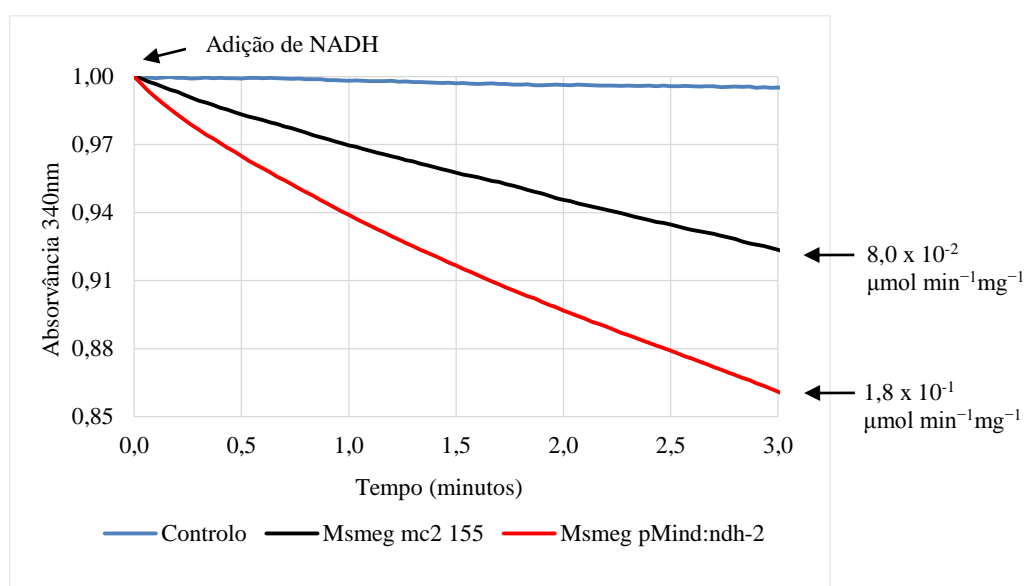


Figura 22 – Curvas normalizadas da variação da absorvância a 340 nm ao longo do tempo para o ensaio controlo (sem membranas) e para as suspensões membranares das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh-2*. As curvas apresentadas correspondem à média de três ensaios realizados, reproduzíveis entre si. Os valores correspondentes à actividade enzimática da NDH-2 nas suspensões membranares encontram-se indicados à direita.

A oxidação de NADH na ausência de membranas (ensaio controlo – Figura 22) é pouco significativa comparativamente ao seu consumo na presença de membranas. Nos ensaios efectuados na presença de membranas verifica-se que a actividade enzimática da proteína NDH-2 na estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* ($1,8 \times 10^{-1} \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) é 2,25 vezes superior à da estirpe *M. smegmatis* mc²155 ($8,0 \times 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Esta observação confirma uma maior sobre-expressão da proteína NDH-2 como sugerido anteriormente pela coloração amarela mais intensa e a maior quantidade de proteína total do sedimento membranar na estirpe transformada (ver pontos 3.4.1 e 3.4.2).

3.4.4 Estudo do efeito dos inibidores de efluxo na actividade enzimática da proteína NDH-2 em suspensões membranares de *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*

A Figura 23 ilustra a variação de absorvância a 340 nm ao longo do tempo em suspensões membranares de *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* obtida na presença dos inibidores de efluxo estudados.

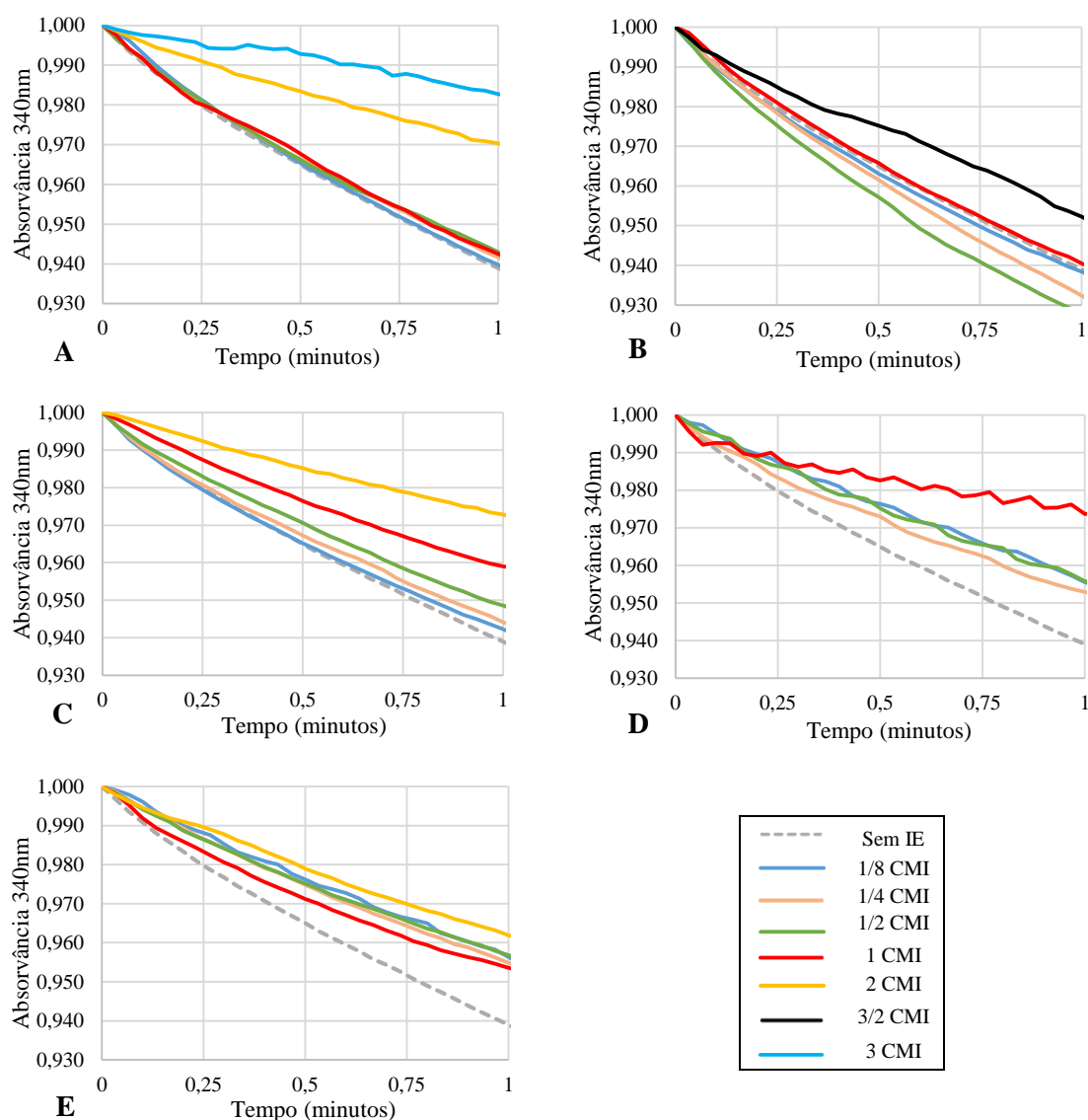


Figura 23 – Curvas normalizadas da variação da absorvância a 340 nm ao longo do tempo obtidas para a suspensão membranares da estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh-2* na presença de diferentes concentrações de inibidores de efluxo. **A:** TZ (CMI: 30 µg/mL); **B:** CPZ (CMI: 60 µg/mL); **C:** VP (CMI: 800 µg/mL); **D:** FPX (CMI: 60 µg/mL); **E:** HAL (CMI: 256 µg/mL). **IE:** inibidor de efluxo; **CMI:** concentração mínima inibitória.

As actividades específicas de NDH-2 determinadas a partir dos registos de variação de absorvância indicados na Figura 23 encontram-se resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 – Actividades específicas da proteína NDH-2 para as suspensões membranares da estirpe *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh*-2.

Razão de CMI	Actividade específica ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)				
	TZ	CPZ	VP	FPX	HAL
0	0,205	0,205	0,205	0,205	0,205
1/8	0,182	0,203	0,208	0,111	0,118
1/4	0,193	0,193	0,197	0,142	0,115
1/2	0,187	0,214	0,190	0,120	0,118
1	0,197	0,209	0,116	0,088	0,136
3/2	-	0,126	-	-	-
2	0,081	-	0,070	0,026	0,095
3	0,042	-	-	-	-

CMI: concentração mínima inibitória; **TZ:** tioridazina (CMI: 30 $\mu\text{g/mL}$ = 74 μM); **CPZ:** clorpromazina (CMI: 60 $\mu\text{g/mL}$ = 169 μM); **VP:** verapamil (CMI 800 $\mu\text{g/mL}$ = 1629 μM); **FPX:** flupentixol (CMI: 60 $\mu\text{g/mL}$ = 118 μM); **HAL:** haloperidol (CMI: 256 $\mu\text{g/mL}$ = 681 μM).

Como se pode verificar, o flupentixol foi o composto mais eficaz na inibição da actividade da enzima NDH-2, tanto para valores de concentração correspondentes ao seu valor de CMI para a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2, como para concentrações duas vezes superior à CMI. Depois do flupentixol, o verapamil e o haloperidol são os compostos mais eficazes.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A tuberculose continua a causar um elevado número de mortes em todo o mundo, apesar dos inúmeros esforços e aplicação de planos de controlo desta infecção [131]. Este problema é agravado pelo aparecimento e disseminação de estirpes de *M. tuberculosis* multi- e extensivamente resistentes, que limitam em muito a eficácia de uma terapia já em si difícil de implementar, sendo por isso necessárias novas opções terapêuticas.

A cadeia respiratória de *M. tuberculosis* tem sido considerada um possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose [132], em particular dada a sua importância tanto para os bacilos em replicação activa, como para aqueles em estado de latência [78]. Neste sentido, a proteína NDH-2 da cadeia respiratória de *M. tuberculosis* tem sido descrita em diversos estudos como alvo potencial para novos fármacos [125, 127, 132]. Trata-se de uma proteína essencial em *M. tuberculosis*, uma vez que qualquer alteração desta proteína torna a célula inviável [86]. Por esta razão, e por não possuir homólogos na mitocôndria humana, compostos que inibam a sua actividade têm sido considerados como possíveis fármacos a serem integrados no tratamento da tuberculose [83].

Neste trabalho usou-se a estirpe *M. smegmatis* mc²155 como modelo para o estudo da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis*. Esta estirpe é frequentemente usada em trabalhos de biologia molecular de micobactérias, uma vez que apresenta diversas vantagens em relação a outras micobactérias particularmente em relação a *M. tuberculosis*. Trata-se de uma bactéria de crescimento rápido, não patogénica e que apresenta elevada eficiência em processos de transformação [68, 72, 96]. Usando *M. smegmatis* como modelo, foi-nos possível estudar e otimizar diferentes parâmetros experimentais em condições de biossegurança de nível 2, facilitando deste modo a execução de todo o procedimento experimental com obtenção de resultados num menor espaço de tempo. Adicionalmente, a utilização de *M. smegmatis* mc²155 como hospedeiro para a expressão da proteína NDH-2 permite obtê-la em condições mais próximas das do seu organismo de origem, face a outras opções, nomeadamente a utilização de *E. coli*.

O plasmídeo pMind foi usado neste trabalho para a produção da proteína NDH-2. Este plasmídeo inclui um sistema de indução que permite regular a sobre-expressão de

genes clonados pela indução por tetraciclina [17]. Este plasmídeo contém ainda um gene de resistência à canamicina, usado como marcador de selecção. Uma vez seleccionado o vector de clonagem e as células hospedeiras para a sobre-expressão da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis*, verificou-se ser necessário optimizar a concentração de tetraciclina para se obterem bons níveis de sobre-expressão. Inicialmente usou-se 20 ng/mL de tetraciclina, como descrito por Blokpoel *et al.* [17], não tendo sido detectada sobre-expressão de NDH-2. Testaram-se de seguida concentrações superiores, nomeadamente 50, 75, 100 e 250 ng/mL, verificando-se a maior expressão para valores iguais ou superiores a 75 ng/mL de tetraciclina.

Uma vez optimizado o sistema de expressão da proteína NDH-2 em *M. smegmatis*, pretendeu-se verificar se a sobre-expressão desta proteína teria algum efeito no fenótipo da estirpe, nomeadamente na susceptibilidade aos antibacilares usados no tratamento da tuberculose, bem como na actividade de efluxo.

- Avaliação da susceptibilidade aos antibacilares das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* e efeito de inibidores de efluxo

Neste trabalho foram testados os antibacilares isoniazida, rifampicina e etambutol, e ainda outros antibióticos, nomeadamente: a capreomicina, que inibe a síntese proteica ao nível de ambas as subunidades ribossomais [2]; a ofloxacina, que inibe a síntese DNA [10]; a canamicina, gentamicina e a amicacina, que inibem a síntese proteica ao nível da subunidade 30S ribossomal [2, 41], tal como a tetraciclina [79]; e por fim a claritromicina e a eritromicina, que inibem a síntese proteica ao nível da subunidade 50S ribossomal [91].

Os resultados de CMIs dos vários antibióticos e inibidores de efluxo testados não mostram diferenças significativas entre as duas estirpes, *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*. Como esperado, os valores de CMI para a canamicina e amicacina foram superiores na estirpe transformada, devido à presença do plasmídeo pMind, que contém o gene de resistência à canamicina (gene *kan^r*). Este determinante codifica para a enzima AAC(3)-V, capaz de inactivar a canamicina e amicacina [39, 41], mas não a gentamicina [40, 90], o que está de acordo com os resultados obtidos para a estirpe transformada. As únicas diferenças registadas, para a rifampicina e claritromicina,

foram na ordem de um factor de diluição. A ausência de diferenças na susceptibilidade aos antibióticos entre as duas estirpes era de algum modo esperada, uma vez que, apesar da proteína NDH-2 estar sobre-expressa na estirpe *M. smegmatis* pMind:ndh-2, à partida não se esperariam diferenças muito significativas nos níveis de resistência a estes compostos. Por outro lado, poder-se-ia ter observado diferença entre as duas estirpes para os compostos inibidores de efluxo que actuam ao nível energético da célula, como é o caso do ortovanadato de sódio, NMP e CCCP, o que não se verificou.

Na determinação de CMIs dos antibióticos na presença de inibidores de efluxo, verificou-se que, para as duas estirpes, as reduções mais significativas registaram-se para os compostos da classe dos macrólidos (claritromicina e eritromicina) na presença dos inibidores haloperidol e flupentixol. Trabalhos anteriores apontam o efluxo como um dos mecanismos de resistência aos macrólidos em *M. smegmatis*, em que tanto para a claritromicina como para a eritromicina se observaram reduções de 8 vezes a CMI com a tioridazina e a clorpromazina e 4 vezes com o verapamil [81], tal como se observou no presente trabalho (Tabela 9). Por outro lado, o efeito dos inibidores haloperidol e flupentixol na resistência a estes antibióticos ainda não tinha sido descrito para micobactérias. Contudo, verificou-se que estes apresentam um efeito tanto ou mais significativo que os compostos referidos anteriormente, tanto para a estirpe original, como para a transformada, o que indica que ambos poderão interferir com o efluxo destes antibióticos.

Relativamente à tetraciclina, também apresenta reduções significativas nos valores de CMI na presença dos inibidores, principalmente no caso da estirpe *M. smegmatis* pMind:ndh-2. Nesta estirpe foi registado efeito inibitório significativo com todos os inibidores testados (Tabela 9). Embora se conheça uma bomba de efluxo de *M. smegmatis*, Tet(V), pertencente à família MFS, que tem como substrato específico a tetraciclina [31], até agora ainda não tinha sido estudado o efeito dos inibidores de efluxo na resistência à tetraciclina em micobactérias. Assim, os nossos resultados mostram que a tetraciclina é um substrato dos sistemas de efluxo em *M. smegmatis*, tendo o efeito dos inibidores sido mais visível para a estirpe transformada.

Em relação aos resultados para o brometo de etídio, observam-se reduções nos valores de CMI com todos os inibidores testados, sendo o maior efeito observado na

presença dos inibidores haloperidol e verapamil, principalmente para a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*. O brometo de etídio é um substrato da maioria das bombas de efluxo bacterianas. Em *M. smegmatis*, a sua extrusão tem sido principalmente associada à bomba de efluxo LfrA [81]. A nível do efeito dos inibidores no efluxo de EtBr, este apenas tinha sido estudado por ensaios de fluorometria em tempo real, que indicavam o verapamil como o composto mais eficaz [81]. O efeito do haloperidol no efluxo de EtBr em ensaios de CMI e fluorometria em tempo real em *M. smegmatis* ainda não tinha sido avaliado até à realização do trabalho que deu origem a esta Dissertação.

Para além do brometo de etídio, as fluoroquinolonas são igualmente substratos da bomba de efluxo LfrA. Assim, esperava-se que o valor de CMI da ofloxacina diminuísse na presença de inibidores de efluxo, o que não se verificou (para as duas estirpes). Isto pode dever-se ao facto de nos estudos publicados que referem este efeito ter sido testada a ciprofloxacina [82], enquanto que neste trabalho se testou a ofloxacina. Sendo, dentro da classe das fluoroquinolonas, um fármaco mais recente, com uma estrutura química diferente [9, 18], a ofloxacina poderá estar menos sujeita ao efluxo, tal como já descrito para outras bactérias, nomeadamente *Staphylococcus aureus* [74].

Em relação à isoniazida, rifampicina e etambutol, estes compostos estão descritos como substratos da bomba de efluxo PstB de *M. smegmatis*, que pertence à família ABC [15]. Contudo, pelos nossos resultados, apenas a rifampicina foi afectada pelos compostos testados, principalmente para a estirpe *M. smegmatis* mc²155, sendo o haloperidol o composto com maior efeito inibitório, o que ainda não tinha sido descrito. No trabalho realizado por Rodrigues *et al.*, foi avaliado o efeito dos inibidores de efluxo tioridazina, clorpromazina e verapamil na susceptibilidade à rifampicina, tendo-se verificado reduções significativas (4 vezes) com a tioridazina e o verapamil [82]. No nosso trabalho, para os mesmos inibidores de efluxo foram observadas reduções da mesma ordem para a estirpe *M. smegmatis* mc²155, enquanto para a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* não se obteve efeito inibitório significativo.

Como referido, não se observou uma acção significativa dos inibidores de efluxo testados ao nível da resistência à isoniazida, para as duas estirpes. A enzima NDH-2 oxida o NADH, o que permite a formação do aducto entre a isoniazida activada pela enzima KatG (pró-fármaco) e o NAD⁺, que se irá ligar e inibir a enzima InhA (responsável pela síntese de ácidos micólicos), interrompendo deste modo a síntese de parede celular, o que

resulta na morte dos bacilos. Verificou-se que mutações no gene que codifica a proteína NDH-2 podem também resultar em resistência à isoniazida. Nesses casos, a redução da actividade da proteína NDH-2 conduz a uma diminuição da actividade de oxidação de NADH, o que origina um aumento do balanço intracelular de NADH/NAD⁺. A diminuição da concentração intracelular de NAD⁺ e consequente redução da quantidade do aducto isoniazida-NAD⁺ resulta num menor efeito do fármaco na síntese dos ácidos micólicos [24, 132]. Dado que a enzima NDH-2 poderá potenciar a acção da isoniazida pela oxidação de NADH [60], poder-se-ia esperar observar uma maior susceptibilidade da estirpe transformada a este fármaco. No entanto, tal não foi observado (Tabela 9).

Relativamente ao etambutol, os efeitos verificados com os inibidores e entre as duas estirpes são praticamente inexistentes (Tabela 9).

Em relação ao trabalho desenvolvido por Rodrigues *et al.* [82], os valores de CMI determinados para a estirpe *M. smegmatis* mc²155 diferem dos obtidos neste trabalho. Os compostos comuns aos dois trabalhos são a claritromicina, a eritromicina, a amicacina, o etambutol, a rifampicina, o verapamil, a tioridazina, a clorpromazina e o brometo de etídio. Em relação aos antibióticos, os valores mais discrepantes correspondem às CMIs da eritromicina e rifampicina. No presente estudo, o valor de CMI para a eritromicina foi de 256 µg/mL, enquanto no estudo anterior se obteve uma CMI de 32 µg/mL. No caso da rifampicina, neste trabalho a CMI foi de 64 µg/mL, enquanto no estudo anterior foi de 4 µg/mL. Contudo, em ambos os estudos houve efeito inibitório dos inibidores de efluxo nos antibióticos com igual proporção de inibição, excepto para o etambutol, em que não detectámos efeito inibitório com nenhum dos compostos inibidores. Relativamente à CMI dos inibidores de efluxo, no nosso trabalho, para a tioridazina, clorpromazina e verapamil obtiveram-se valores de 30 µg/mL, 60 µg/mL e 800 µg/mL, respectivamente; enquanto no trabalho anterior os valores de CMI foram de 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Além disso, para o brometo de etídio o valor de CMI neste trabalho foi 12 µg/mL e no trabalho anteriormente publicado foi de 6,25 µg/mL. Estas diferenças poderão ser devidas ao facto da técnica utilizada para a determinação de CMIs, o método de microdiluição em placa, ser uma técnica pouco precisa, com uma leitura dos resultados subjectiva, que é dependente tanto do operador como da preparação do inóculo. Este último aspecto é particularmente decisivo nos resultados obtidos, podendo uma pequena diferença na preparação dos inóculos originar resultados muito distintos. Uma alternativa

para tornar a técnica mais objectiva seria usar um corante para avaliação de viabilidade celular, por exemplo o MTT (do inglês “tetrazolium salt thiazolyl blue”) [102], ou fazer uma leitura espectrofotométrica do crescimento bacteriano nos poços da microplaca [49].

A determinação de CMI's na ausência ou presença de inibidores de efluxo permitiu-nos avaliar o efeito destes compostos no efluxo de antibióticos e brometo de etídio a longo prazo. De seguida, avaliou-se o efeito destes mesmos compostos no efluxo de brometo de etídio a curto prazo, utilizando fluorometria em tempo real.

- Avaliação da actividade de efluxo em tempo real das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh-2* e efeito de inibidores de efluxo

De modo a avaliar a capacidade de efluxo de ambas as estirpes e a acção dos compostos inibidores nesta actividade, realizaram-se ensaios fluorometria em tempo real usando brometo de etídio, um substrato da maioria das bombas de efluxo [120].

Inicialmente, foram realizados ensaios de acumulação de brometo de etídio a diferentes concentrações, na presença e ausência de glucose (Figuras 13 e 14). Estes ensaios permitiram-nos determinar qual a concentração mínima ou basal de brometo de etídio para a qual não existe acumulação, isto é, a concentração que permite um equilíbrio entre a entrada de EtBr por difusão passiva (influxo) e a sua expulsão por efluxo [117, 118]. A concentração basal de EtBr determinada para as duas estirpes foi a mesma (0,25 µg/mL), o que indica que ambas possuem a mesma capacidade de extrusão do composto. O valor de CMI do brometo de etídio para as duas estirpes é igual, o que é concordante com os resultados obtidos nos ensaios de acumulação de EtBr. Na presença de glucose, verificou-se uma diminuição da acumulação deste substrato, sendo esta diferença ligeiramente superior na estirpe transformada. De forma a confirmar se esta diferença não se poderia dever à presença do plasmídeo pMind, o plasmídeo pMind sem o gene *ndh-2*, foi introduzido por electroporação em *M. smegmatis* mc²155. As curvas de acumulação de brometo de etídio desta estirpe são equivalentes às da estirpe original (dados não apresentados), o que confirma que o efeito observado na estirpe transformada não se deve à presença do plasmídeo, devendo resultar da sobre-expressão de NDH-2.

Nos ensaios de acumulação efectuados na presença de inibidores, verificou-se que o verapamil foi o composto com maior efeito nas duas estirpes (Figuras 15 e 16), tal como

demonstrado em estudos anteriores para a estirpe *M. smegmatis* mc²155 [81], o que indica que é o composto mais eficaz a inibir o efluxo deste substrato num curto período de tempo. Na presença de glucose, verificou-se uma menor acumulação de EtBr na presença dos inibidores, embora se trate de um efeito mínimo.

Uma vez que o verapamil foi o composto mais eficaz nos ensaios de acumulação, foi este o composto seleccionado para acumular o EtBr no interior das células para a realização dos ensaios de efluxo. Os resultados obtidos permitiram confirmar que o verapamil é um composto bastante eficaz no bloqueio do efluxo de EtBr. Verificou-se que a tioridazina e a clorpromazina têm também um efeito inibitório no efluxo de EtBr para as duas estirpes (Figuras 17 e 18), sendo estes resultados concordantes com os obtidos anteriormente para a estirpe *M. smegmatis* mc²155 [82].

Em termos de comparação entre as duas estirpes, na maioria dos ensaios realizados observou-se que a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* apresenta menor actividade de efluxo, relativamente à estirpe original. No entanto, verifica-se um maior efeito da glucose na actividade de efluxo da estirpe transformada (Figura 18), o que poderá ser explicado pela sobre-expressão da proteína NDH-2.

Tanto os ensaios de acumulação como de efluxo na ausência de inibidores evidenciam que a estirpe transformada possui menor capacidade de efluxar EtBr (Figuras 13, 14, 17 e 18). No entanto, quando se fornece energia sob a forma de glucose, estas células apresentam uma maior diferença na actividade de efluxo. A glucose está descrita como uma fonte energética que pode influenciar o funcionamento dos sistemas de efluxo [29]. A oxidação desta fonte de carbono em condições aeróbias pelas células, via glicólise e ciclo do ácido cítrico, conduz à produção de NADH. Na estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2*, a presença de um maior número de moléculas de NDH-2 aumenta a capacidade de oxidação do NADH ao nível da cadeia transportadora de electrões, o que permite que as células possam manter os níveis de energização da membrana elevados e, deste modo, disponibilizar a energia necessária ao funcionamento dos sistemas de efluxo.

Embora à partida se pudesse esperar que o mesmo se aplicasse à actividade de efluxo da estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* nas outras condições testadas (ausência de glucose), isso não se verificou na maior parte dos casos, embora se tenha verificado alguma inconstância nas curvas de efluxo obtidas para esta estirpe. Esta variabilidade, em

conjunto com a experiência do grupo, onde foram realizados estes ensaios, no estabelecimento de protocolos de avaliação de actividade de efluxo em tempo real para diferentes bactérias, sugerem que se poderá estar perante um caso de um efluxo demasiado rápido, que não é detectado nestes ensaios, nas condições experimentais utilizadas. Deste modo, a actividade observada para esta estirpe corresponderia a uma actividade de efluxo residual. Embora não tenha sido possível confirmar esta hipótese, o que exigiria a repetição destes ensaios em condições que reduzissem a velocidade de efluxo, nomeadamente a utilização de temperaturas mais baixas, na experiência do nosso grupo, esta pode ser uma hipótese plausível para explicar os resultados observados.

Uma outra possível interpretação para estes resultados, que também tem em conta os resultados obtidos na determinação das CMI's para diferentes compostos, é que nos dois tipos de ensaio utilizaram-se culturas a meio da fase logarítmica de crescimento (DO_{600} de 0,8). Este facto, e em particular no caso da estirpe transformada em que a indução da expressão da proteína NDH-2 só ocorre quando a DO_{600} atingiu um valor de 0,5, poderá não ser suficiente para obter níveis de sobre-expressão de NDH-2 suficientemente altos para se refletirem em alterações dos fenótipos em análise.

Comparando os resultados dos ensaios de efluxo com os valores de CMI do brometo de etídio na presença dos inibidores, verificamos que, de um modo geral, os compostos com maior efeito nesta actividade são o verapamil, o flupentixol e o haloperidol para as duas estirpes. No entanto, o verapamil apresenta um efeito mais notório tanto num curto período de tempo (ensaios de acumulação/efluxo) como em períodos mais longos, que já envolvem crescimento e multiplicação celular (determinação de CMI's), enquanto o flupentixol e o haloperidol apresentam maior efeito a longo prazo (CMI's), o que poderá ser importante para no futuro tentar compreender melhor o efeito destes compostos na célula, nomeadamente ao nível dos sistemas de efluxo.

- Actividade enzimática das suspensões membranares das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh*-2

Embora o principal objectivo desta Dissertação se prenda com uma melhor compreensão do papel funcional da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* a nível do seu envolvimento na resistência aos antibacilares, em particular aquela mediada pelos sistema de efluxo, no futuro pretende-se caracterizar esta proteína a um nível mais detalhado, sendo para isso necessário a sua purificação. Por essa razão, durante este trabalho foram efectuados os primeiros passos no sentido de estabelecer um protocolo de purificação desta proteína, o qual requer ainda optimização, devendo ser objecto de trabalhos futuros.

Neste trabalho foi determinada a actividade enzimática da proteína NDH-2 em suspensões membranares das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2. Esta abordagem permitiu-nos monitorizar a actividade da proteína no seu ambiente membranar, o que excluiu a ocorrência de possíveis alterações funcionais resultantes dos processos de isolamento a partir da membrana celular. Os valores de actividade enzimática determinados para a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 foram 2,25 vezes superiores aos da estirpe *M. smegmatis* mc²155 (Figura 22). A actividade enzimática detectada para a estirpe *M. smegmatis* mc²155 é devida à NADH-desidrogenase do tipo II de *M. smegmatis*, que apresenta uma elevada homologia com a NDH-2 de *M. tuberculosis*, com a qual partilha 81% de semelhança na sequência de aminoácidos [60]. A maior actividade observada para a estirpe *M. smegmatis* pMind:*ndh*-2 confirma assim que a proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* se encontra activa e funcional nestas suspensões membranares.

Esta análise foi complementada com a monitorização da actividade enzimática da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* na presença dos compostos com os quais se observou maior efeito na diminuição do valor das CMI de antibióticos e/ou maior inibição na actividade de efluxo; tioridazina, verapamil, clorpromazina, flupentixol e haloperidol. Na Tabela 12 apresenta-se um resumo do efeito de cada um destes compostos, a diferentes concentrações em relação à sua CMI, na actividade específica da NDH-2 de *M. tuberculosis*.

Tabela 12 – Percentagem de actividade específica da proteína NDH-2 em suspensões membranares de *M. smegmatis* mc²155 pMind:*ndh-2* na presença de inibidores de efluxo.

Razão de CMI	Actividade específica (%) ¹				
	TZ	CPZ	VP	FPX	HAL
0	100	100	100	100	100
1/8	89	99	102	54	58
1/4	94	94	96	70	56
1/2	92	104	93	58	58
1	96	102	57	43	66
3/2	-	62	-	-	-
2	40	-	34	13	46
3	21	-	-	-	-

(1) Considerando como 100% a actividade específica determinada nos ensaios efectuados na ausência de inibidor. CMI de **TZ** (tioridazina): 74 µM; **CPZ** (clorpromazina): 169 µM; **VP** (verapamil): 1629 µM; **FPX** (flupentixol): 118 µM; **HAL** (haloperidol): 681 µM.

De entre os vários compostos testados, verifica-se que o maior efeito na diminuição da actividade enzimática da proteína NDH-2 em suspensões membranares de *M. smegmatis* pMind:*ndh-2* é observado para o flupentixol, o haloperidol e o verapamil, os quais apresentaram também maior efeito na diminuição da actividade de efluxo destas células. De entre estes três compostos, o flupentixol apresenta o maior efeito para valores de concentração correspondentes ao valor da CMI e superiores, seguido do verapamil e do haloperidol. Em relação às duas fenotiazinas testadas (tioridazina e clorpromazina) não se regista uma diminuição significativa da actividade da proteína NDH-2 para valores correspondentes à sua CMI, sendo apenas detectados efeitos para concentrações superiores.

Contudo, a análise destes mesmo efeitos tendo em conta a molaridade dos compostos envolvidos indica que o flupentixol e a tioridazina são aqueles que apresentam maior efeito na diminuição da actividade da proteína NDH-2 a concentrações mais baixas, seguindo-se o haloperidol, enquanto para o verapamil são necessárias concentrações muito mais elevadas para se observar um efeito significativo (Figura 24).

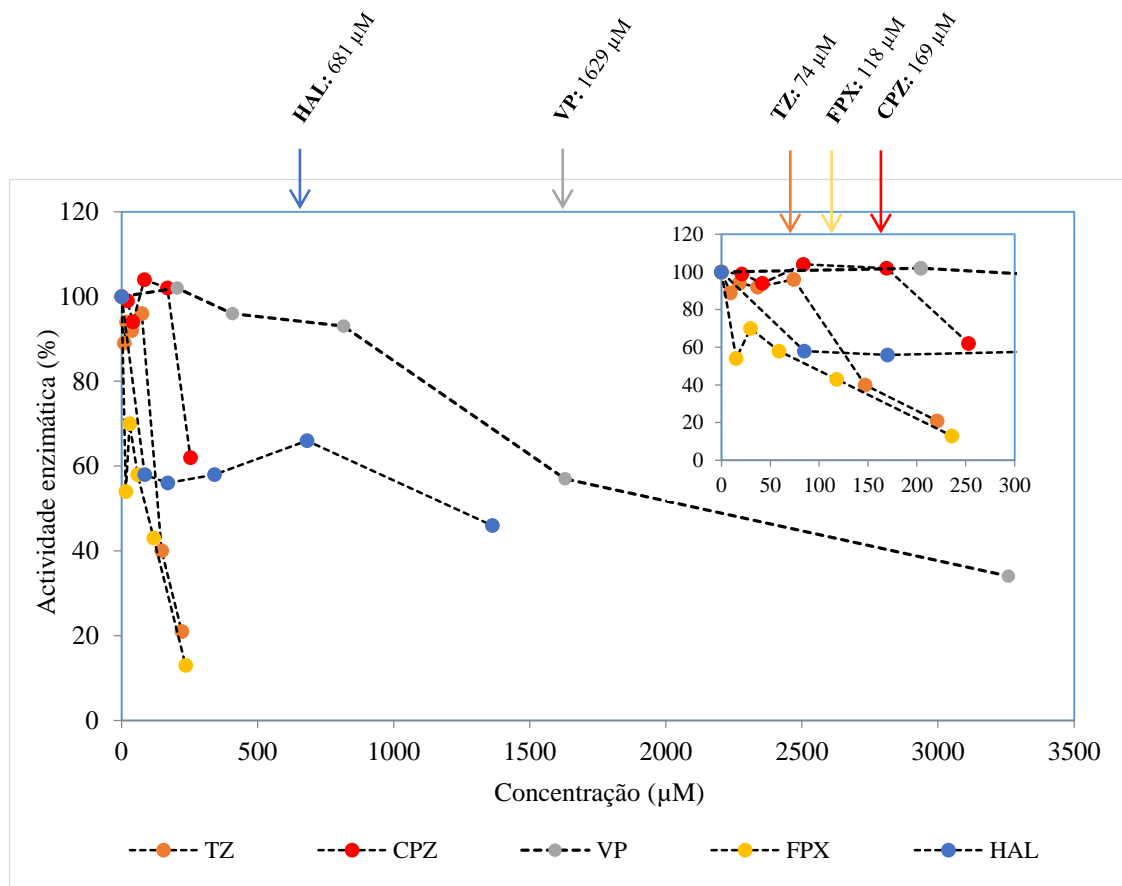


Figura 24 – Variação da percentagem de actividade específica da proteína NDH-2 em suspensões membranares de *M. smegmatis* mc²155 pMind:ndh-2 com a concentração (em µM) dos inibidores de efluxo tioridazina (TZ), clorpromazina (CPZ); verapamil (VP); flupentixol (FPX) e haloperidol (HAL). Considerou-se como 100% a actividade específica determinada nos ensaios efectuados na ausência de inibidor. O gráfico interior representa uma expansão até à concentração de 300 µM.

Em relação às duas fenotiazinas testadas, quando usadas a cerca de 200 µM, a clorpromazina inibiu aproximadamente 38% da actividade da enzima NDH-2, enquanto na presença de tioridazina ocorreu cerca de 79% de inibição da actividade desta enzima. Os resultados obtidos são concordantes com estudos já realizados, que demonstram o efeito inibitório das fenotiazinas na actividade enzimática de NDH-2. No estudo realizado por Yano *et al.*, verificou-se que compostos da classe fenotiazinas, nomeadamente a triflupromazina, são capazes de inibir significativamente a actividade da enzima NDH-2 [132]. Em relação ao estudo realizado por Warman *et al.*, verificou-se que a tioridazina apresenta efeito inibitório na actividade da enzima NDH-2, seguida da clorpromazina [125], o que é concordante com os nossos resultados.

Com base em trabalhos anteriores [123], o verapamil é um dos compostos que apresenta maior efeito inibitório em micobactérias. Apesar de não pertencer à classe das fenotiazinas, tem um modo de acção semelhante em micobactérias por inibição dos canais de cálcio e interferência no efluxo [81]. No nosso trabalho, o verapamil foi capaz de inibir cerca de 66% da actividade da enzima NDH-2, mas apenas quando testado a cerca de 3250 μM .

Relativamente ao flupentixol, este composto difere das fenotiazinas no anel central, com um átomo de carbono no lugar do átomo de nitrogénio [123]. Esta alteração permite uma potenciação do composto, e neste trabalho verificámos que a sua eficácia ao nível de inibição da enzima NDH-2 é superior ao das fenotiazinas. De facto, a uma concentração de 237 μM , o flupentixol inibiu cerca de 87% da actividade da enzima, enquanto para uma concentração equivalente (221 μM) a tioridazina inibiu cerca de 79% da actividade desta enzima. Estes resultados são diferentes dos descritos por Warman *et al.*, que descreveram que o flupentixol apresentava um efeito inferior ao da tioridazina na inibição da actividade enzimática [125], o que não se verificou nos nossos ensaios.

Apesar do efeito inibitório do verapamil nos ensaios fenotípicos ser aparentemente superior ao do flupentixol, as concentrações utilizadas são bastante diferentes, sendo a concentração de verapamil (3250 μM) 14 vezes superior à de flupentixol (237 μM).

O haloperidol é um composto com efeito farmacológico idêntico ao das fenotiazinas, descrito como inibidor de efluxo em *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* [77]. Os resultados indicam que o haloperidol possui também um efeito inibitório considerável na actividade enzimática de NDH-2 (cerca de 54%), embora para molaridades superiores às de flupentixol ou tioridazina (1362 μM). O efeito inibitório da actividade enzimática de NDH-2 pelo haloperidol ainda não tinha sido avaliado até à realização deste trabalho. Assim, os nossos resultados evidenciam que o haloperidol poderá interferir na actividade da enzima NDH-2 na cadeia respiratória de *M. tuberculosis*, o que abre novas perspectivas para a sua investigação tendo em vista uma eventual actuação sinérgica com os antibacilares.

Na Tabela 13 apresenta-se um quadro resumo dos resultados obtidos neste trabalho para as duas estirpes.

Tabela 13 – Quadro resumo dos resultados obtidos para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e *M. smegmatis* pMind:ndh-2 nos diferentes ensaios realizados.

Parâmetro avaliado		Actividade observada (comparação entre estirpes)
CMI	Antibióticos	Sem diferenças significativas
	Inibidores de efluxo	Sem diferenças
	Antibióticos na presença de inibidores de efluxo	HAL, FPX e VP mais eficazes nas duas estirpes
Actividade efluxo	Acumulação de EtBr	Diminuição na estirpe transformada (com glucose)
	Acumulação de EtBr com inibidores de efluxo	VP mais eficaz nas duas estirpes
	Efluxo	Superior na estirpe original (Na estirpe transformada superior na presença de glucose)
Actividade enzimática NDH-2	Sem inibidores de efluxo	NDH-2 activa na estirpe transformada
	Com inibidores de efluxo	FPX, HAL e VP mais eficazes

CMI: concentração mínima inibitória; HAL: haloperidol; FPX: flupentixol; VP: verapamil; EtBr: brometo de etídio.

- Conclusões finais e perspectivas futuras

Embora o Grupo de Micobactérias do IHMT/UNL tenha já realizado diversos trabalhos sobre a actividade de efluxo em micobactérias, nomeadamente em *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. smegmatis* [55, 81, 82, 123], o efeito da expressão de uma proteína da cadeia respiratória nesta actividade não tinha sido estudado até à data. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram-nos demonstrar o potencial da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* como possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose.

Ao longo deste trabalho utilizaram-se diferentes estratégias e abordagens experimentais, que nos permitiram estudar diferentes aspectos do efeito da actividade desta enzima e da inibição desta mesma actividade, a nível celular, procurando-se seguir uma análise cada vez mais detalhada e específica ao longo do estudo.

Numa primeira fase, determinaram-se as CMIs para diferentes antibióticos, na ausência e presença de compostos descritos como inibidores de efluxo. Os resultados

obtidos permitiram-nos ter uma ideia do comportamento geral das células após uma incubação prolongada com estes vários compostos, tendo-se observado que o haloperidol, o verapamil e o flupentixol foram os compostos que provocaram reduções mais significativas nas CMI de antibióticos que são expelidos por bombas de efluxo, nomeadamente a claritromicina, a eritromicina e a tetraciclina, tendo-se também verificado importantes efeitos para o brometo de etídio, um substrato geral dos sistemas de efluxo.

A abordagem seguinte, de realização de ensaios de efluxo em tempo real, permitiu analisar detalhadamente a resposta celular, em termos de actividade de efluxo, aos vários inibidores e condições em estudo. Estes ensaios permitiram-nos observar que o verapamil foi o composto mais eficaz na inibição desta actividade e que a presença de glucose tem um maior efeito na actividade de efluxo da estirpe transformada.

Por último, foi analisada a actividade enzimática em suspensões membranares, tendo-se verificado que a proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* se encontrava activa e funcional, e que a sua actividade é mais afectada na presença de flupentixol, haloperidol e verapamil, os três compostos que já tinham apresentado maior efeito nos ensaios anteriores. No entanto, a análise destes mesmo efeitos considerando a molaridade dos compostos envolvidos, permite-nos ter uma perspectiva adicional da actividade inibitória de cada uma destas moléculas. De facto, conjugando esta informação com a dos ensaios de actividade enzimática, verificamos que o flupentixol parece ser a molécula que actua mais eficazmente na actividade enzimática da NDH-2 de *M. tuberculosis*, o que abre novas perspectivas para estudos futuros da sua utilização como um eventual adjuvante terapêutico. Verifica-se também que os outros dois compostos, haloperidol e verapamil, têm um efeito significativo como inibidores da actividade enzimática da NDH-2 de *M. tuberculosis*, embora a concentrações bastante mais elevadas, particularmente no caso do verapamil. Por último, é de referir a tioridazina, a qual, embora não tenha tido efeitos tão óbvios nos ensaios anteriores como os três compostos já mencionados, apresenta um efeito inibidor da NDH-2 de *M. tuberculosis* bastante semelhante ao do flupentixol na gama de 200-250 μM , o que poderá também ser explorado no futuro, a nível da actividade desta enzima e seus inibidores, como adjuvantes na terapia contra a tuberculose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbate, E., M. Vescovo, M. Natiello, M. Cufre, A. Garcia, P. G. Montaner, M. Ambroggi, V. Ritacco, and D. Van Soolingen.** 2012. Successful alternative treatment of extensively drug-resistant tuberculosis in Argentina with a combination of linezolid, moxifloxacin and thioridazine. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:473–477.
2. **Alangaden, G. J., B. N. Kreiswirth, A. Aouad, F. R. Igno, S. L. Moghazeh, E. K. Manavathu, and S.A. Lerner.** 1998. Mechanism of Resistance to Amikacin and Kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1295–1297.
3. **Amaral, L., J. E. Kristiansen, M. Viveiros, and J. Atouguia.** 2001a. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as anti-tuberculosis therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:505–511.
4. **Amaral, L., M. Viveiros, and J. E. Kristiansen.** 2001b. Phenothiazines: potential alternatives for the management of antibiotic resistant infections of tuberculosis and malaria in developing countries. *Trop. Med. Int. Health.* **6**:1016–1022.
5. **Amaral, L., M. Martins, and M. Viveiros.** 2007. Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:1237–1246.
6. **Amaral, L., A. Martins, J. Molnar, J. E. Kristiansen, M. Martins, M. Viveiros, L. Rodrigues, G. Spengler, I. Couto, J. Ramos, S. Dastidar, S. Fanning, M. McCusker, and J. M. Pages.** 2010. Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. *In Vivo.* **24**:409–424.
7. **Amaral, L., and M. Viveiros.** 2012. Why thioridazine in combination with antibiotics cures extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **39**:376–380.

8. **Andersen C. L., I. B. Holland, and A. Jacq.** 2006. Verapamil, a Ca^{2+} channel inhibitor acts as a local anesthetic and induces the sigma E dependent extra-cytoplasmic stress response in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**:1587–1595.
9. **Andersson, M. I., and A. P. MacGowan.** 2003. Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1–11.
10. **Aubry, A., N. Veziris, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, V. Jarlier, and L. M. Fisher.** 2006. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutante enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:104-112.
11. **Bald, D., and A. Koul.** 2010. Respiratory ATP synthesis: the new generation of mycobacterial drug targets? *FEMS Microbiol. Lett.* **308**:1–7.
12. **Balganesh, M., N. Dinesh, S. Sharma, S. Kuruppath, A. V. Nair, and U. Sharma.** 2012. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:2643–2651.
13. **Bandeiras, T..** 2003. The respiratory chain of the thermophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: studies on the type-II NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1557**:13–19.
14. **Beresford, R., and A. Ward.** 1987. Haloperidol decanoate. A preliminar review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in psychosis. *Drugs.* **33**:31-49.
15. **Bhatt, K., S. K. Banerjee, and P. K. Chakraborti.** 2000. Evidence that phosphate specific transporter is amplified in a fluoroquinolone resistant *Mycobacterium smegmatis*. *Eur. J. Biochem.* **267**:4028–4032.
16. **Bishop, P., and G. Neumann.** 1970. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle.* **51**:196-206.
17. **Blokpoel, M. C., H. N. Murphy, R. O'Toole, S. Wiles, E. S. Runn, G. R. Stewart, D. B. Young, and B. D. Robertson.** 2005. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Res.* **33**:e22.
18. **Blondeau, J. M..** 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv. Ophthalmol.* **49**:73–78.

19. **Bogen, E., and O. View.** 1948. Streptomycin Treatment for Tuberculosis, *J. Natl. Med. Assoc.* **40**:32–33.
20. **Bohnert, J. A., and W. V. Kern.** 2005. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:849-852.
21. **Boshoff, H. I. M., T. G. Myers, B. R. Copp, M. R. McNeil, M. Wilson, and C. E. Barry.** 2004. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* **279**:40174–40184.
22. **Boshoff, H. I. M., and C. E. Barry.** 2005. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:70–80.
23. **Bott, M., and A. Niebisch.** 2003. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**:129–153.
24. **Cardoso, R. F., M. A. Cardoso, C. Q. F. Leite, D. N. Sato, E. M. Mamizuka, R. D. C. Hirata, F. F. de Mello, and M. H. Hirata.** 2007. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**:59–61.
25. **CDC.** 2013. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/tb/>. Acedido em Maio, 2013.
26. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2004. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EUA.
27. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**: 537–544.

28. **Cole, S. T., and G. Riccardi.** 2011. New tuberculosis drugs on the horizon. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**:570–576.
29. **Conrad, R. S., R. G. Wulf, and D. L. Clay.** 1979. Effects of Carbon Sources on Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**:59-66.
30. **Daniel, W., and J. Wójcikowski.** 1999. The role of lysosomes in the cellular distribution of thioridazine and potential drug interactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**:115–124.
31. **De Rossi, E., M. C. J. Blokpoel, R. Cantoni, G. Riccardi, D. B. Young, K. A. De Smet, and O. Ciferri.** 1998. Molecular Cloning and Functional Analysis of a Novel Tetracycline Resistance Determinant, *tet* (V), from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1931-1937.
32. **DGS.** 2013. Direcção-Geral da Saúde. <http://www.dgs.pt/>. Acedido em Maio 2013.
33. **Duncan, K., J. T. Lonsdale, and H. Rubin.** 2005. Inhibitors of type II NADH:menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **102**:4548–4553.
34. **Etienne, G., F. Laval, C. Villeneuve, P. Dinadayala, A. Abouwarda, D. Zerbib, A. Galamba, and M. Daffé.** 2005. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc²155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology.* **151**:2075–2086.
35. **Field, S. K., D. Fisher, J. M. Jarand, and R. L. Cowie.** 2012. New treatment options for multidrug-resistant tuberculosis. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **6**:255–268.
36. **Fisher, N., A. J. Warman, S. A. Ward, and G. A. Biagini.** 2009. Chapter 17 Type II NADH: quinone oxidoreductases of *Plasmodium falciparum* and *Mycobacterium tuberculosis* kinetic and high-throughput assays. *Methods Enzymol.* **456**:303-320.
37. **Ginsberg, A. M.** 2010. Drugs in development for tuberculosis. *Drugs* **70**:2201–2214.
38. **Hurdle, J. G., A. J. O'Neill, I. Chopra, and R. E. Lee.** 2011. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:62–75.

39. **Ishikawa, J., Y. Koyama, S. Mizuno, and K. Hotta.** 1988. Mechanism of increased kanamycin-resistance generated by protoplast regeneration of *Streptomyces griseus*. II. Mutational gene alteration and gene amplification. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **41**:104–112.
40. **Ishikawa, J., and K. Hotta.** 1991. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the kan gene encoding an aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from *Streptomyces griseus* SS-1198PR. **108**:127–132.
41. **Jana, S., and J. K. Deb.** 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**:140–150.
42. **Jørgensen, A., J. Andersen, N. Bjørndal, S. J. Dencker, L. Lundin, and U. Malm.** 1982. Serum concentrations of cis(Z)-flupentixol and prolactin in chronic schizophrenic patients treated with flupentixol and cis(Z)-flupentixol decanoate. *Psychopharmacology*. **77**:58–65.
43. **Jutila, A., T. Söderlund, A. L. Pakkanen, M. Huttunen, and P. K. Kinnunen.** 2001. Comparison of the effects of clozapine, chlorpromazine, and haloperidol on membrane lateral heterogeneity. *Chem. Phys. Lipids*. **112**:151–163.
44. **Kerscher, S., S. Dröse, V. Zickermann, and U. Brandt.** 2007. The Three Families of Respiratory NADH Dehydrogenases. *Results Probl. Cell Differ.* **45**:185-222
45. **Koul, A., E. Arnoult, N. Lounis, J. Guillemont, and K. Andries.** 2011. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **469**:483–490.
46. **Kristiansen, J. E., and B. Vergmann.** 1986. The antibacterial effect of selected phenothiazines and thioxanthenes on slow-growing mycobacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B*. **94**:393-398.
47. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
48. **Lee, A. S., A. S. Teo, and S. Y. Wong.** 2001. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2157-2159.
49. **Lee, J. Y., E. J. Lee, S. H. Kim, H. S. Jeong, S. H. Oh, H. R. Kim, J. N. Lee, C. L. Chang, W. G. Kho, and J. H. Shin.** 2009. The optimal wavelength of

- spectrophotometric broth microdilution antifungal susceptibility test for flucytosine and three azoles. *Korean J. Lab. Med.* **29**:324–330.
50. **Li, X., L. Zhang, H. Nikaido, X. Li, L. Zhang, and H. Nikaido.** 2004. Efflux Pump-Mediated Intrinsic Drug Resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2415-2423.
 51. **López-Muñoz, F., C. Alamo, E. Cuenca, W. W. Shen, P. Clervoy, and G. Rubio.** 2005. History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Ann. Clin. Psychiatry.* **17**:113-135.
 52. **Lorian, V.** 1996. Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. Williams & Wilkins, USA.
 53. **Louw, G. E., R. M. Warren, N. C. Gey van Pittius, C. R. E. McEvoy, P. D. Van Helden, and T. C. Victor.** 2009. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3181–3189.
 54. **Machado, M.** 2009. Dinâmica fisiológica e mutacional da multirresistência em *Mycobacterium tuberculosis*. Tese de Mestrado Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
 55. **Machado, D., I. Couto, J. Perdigão, L. Rodrigues, I. Portugal, P. Baptista, B. Veigas, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2012. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One.* **7**:e34538.
 56. **Malik, Z. A., G. M. Denning, and D. J. Kusner.** 2000. Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J. Exp. Med.* **191**:287–302.
 57. **Marquez, B.** 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie.* **87**:1137–1147.
 58. **Martins, M., Z. Schelz, A. Martins, J. Molnar, G. Hajös, Z. Riedl, M. Viveiros, I. Yalcin, E. Aki-Sener, and L. Amaral.** 2007. *In vitro* and *ex vivo* activity of thioridazine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29**:338–340.
 59. **Melo, A. M. P., T. M. Bandejas, and M. Teixeira.** 2004. New insights into type II NAD(P)H :quinone oxidoreductases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:603–616.

60. **Miesel, L., T. R. Weisbrod, J. A. Marcinkeviciene, R. Bittman, and W. R. Jr. Jacobs.** 1998. NADH Dehydrogenase Defects Confer Isoniazid Resistance and Conditional Lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **180**:2459-2467.
61. **Mitchison, D., and G. Davies.** 2012. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **16**:724–732.
62. **Müller, B., S. Borrell, G. Rose, and S. Gagneux.** 2012. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet.* **29**:160-169.
63. **Muto, A., and S. Osawa.** 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **84**:166–169.
64. **Nantapong, N., A. Otofujii, C. T. Migita, O. Adachi, H. Toyama, and K. Matsushita.** 2005. Electron transfer ability from NADH to menaquinone and from NADPH to oxygen of type II NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**:149–159.
65. **Nguyen, L., and C. J. Thompson.** 2006. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol.* **14**:304–312.
66. **Nikaido, H.** 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:516-523.
67. **Nikaido, H.** 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:593-656.
68. **O’Toole, R.** 2010. Experimental models used to study human tuberculosis. *Adv. Appl. Microbiol.* **71**:75–89.
69. **Ohlow, M. J., and B. Moosmann.** 2011. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology’s first lead structure. *Drug Discov. Today.* **16**:119–131.
70. **Pagès, J. M., and L. Amaral.** 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**:826–833.
71. **Paixão, L., L. Rodrigues, I. Couto, M. Martins, P. Fernandes, C. CCR de Carvalho, G. A. Monteiro, F. Sansonetty, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2009. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J. Biol. Eng.* **3**:18.

72. **Parish, T., and N. Stoker.** 1998. *Methods in Molecular Biology. Mycobacteria Protocols.* 1st ed. Humana Press. U.S.A.
73. **Piddock, L. J. V..** 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:382–402.
74. **Poole, K..** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:20-51.
75. **Poole, K..** 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* **39**:162–176.
76. **Ramaswamy, S., and J. M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber. Lung Dis.* **79**:3–29.
77. **Ramón-García, S., C. Ng, H. Anderson, J. D. Chao, X. Zheng, T. Pfeifer, Y. Av-Gay, M. Roberge, and C. J. Thompson.** 2011. Synergistic drug combinations for tuberculosis therapy identified by a novel high-throughput screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:3861–3869.
78. **Rao, S. P. S., S. Alonso, L. Rand, T. Dick, and K. Pethe.** 2008. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**:11945–11950.
79. **Rasmussen, B., H. F. Noller, G. Daubresse, B. Oliva, Z. Misulovin, D. M. Rothstein, G. A. Ellestad, Y. Gluzman, F. P. Tally, and I. Chopra.** 1991. Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2306–2311.
80. **Riccardi, G., M. R. Pasca, and S. Buroni.** 2009. *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance and future perspectives. *Future Microbiol.* **4**:597–614.
81. **Rodrigues, L., D. Wagner, M. Viveiros, D. Sampaio, I. Couto, M. Vavra, W. V. Kern, and L. Amaral.** 2008. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob. Chemother.* **61**:1076–1082.

82. **Rodrigues, L., J. Ramos, I. Couto, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2011. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiol.* **11**:35.
83. **Sacchettini, J. C., E. J. Rubin, and J. S. Freundlich.** 2008. Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:41–52.
84. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
85. **Sander, P., E. De Rossi, B. Böddinghaus, R. Cantoni, M. Branzoni, E. C. Böttger, H. Takiff, R. Rodriguez, G. Lopez and G. Riccardi.** 2000. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**:19–23.
86. **Sasseti, C. M., and E. J. Rubin.** 2003. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:12989-12994.
87. **Schmid, R., and D. L. Gerloff.** 2004. Functional properties of the alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase from *E. coli* through comparative 3-D modelling. *FEBS Lett.* **578**:163-168.
88. **Schumacher, A., P. Steinke, J. A. Bohnert, M. Akova, D. Jonas, and W. V. Kern.** 2006. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:344–348.
89. **Sharma, S., and A. Singh.** 2011. Phenothiazines as anti-tubercular agents: mechanistic insights and clinical implications. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **20**:1665–1676.
90. **Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**:138–163.
91. **Shinkai, M., M. O. Henke, and B. K. Rubin.** 2008. Macrolide antibiotics as immunomodulatory medications: proposed mechanisms of action. *Pharmacol. Ther.* **117**:393–405.

92. **Sigma-Aldrich**. 2013. <http://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>. Acedido em Agosto 2013.
93. **Silva, P. E. A., A. Von Groll, A. Martin, and J. C. Palomino**. 2011. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**:1–9.
94. **Smeulders, M. J., J. Keer, R. A. Speight, and H. D. Williams**. 1999. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J. Bacteriol.* **181**:270–283.
95. **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk**. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**:76–85.
96. **Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs**. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**:1911–1919.
97. **Somoskovi, A., L. M. Parsons, and M. Salfinger**. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.* **2**:164–168.
98. **Song, H., R. Sandie, Y. Wang, M. A. Andrade-Navarro, and M. Niederweis**. 2009. Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **88**:526–544.
99. **Soolingen, D., R. Hernandez-Pando, H. Orozco, D. Aguilar, C. Magis-Escurra, L. Amaral, J. van Ingen, and M. J. Boeree**. 2010. The antipsychotic thioridazine shows promising therapeutic activity in a mouse model of multidrug-resistant tuberculosis. *PloS One.* **5**:e12640.
100. **Sousa, J., A. Rodrigues e F. Exposto**. 2000. *Mycobacterium*. p85–98. In W.F.C. Ferreira and J.C.F. de Sousa, *Microbiologia*, vol.2. Lidel-edições técnicas, Lisboa.
101. **Steenwinkel, J. E. M., G. J. de Knecht, M. T. Kate, A. Belkum, H. A. Verbrugh, K. Kremer, D. Soolingen, and I. A. Bakker-Woudenberg**. 2010. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:2582–2589.

102. **Stockert, J. C., A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin, and A. Villanueva.** 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* **114**:785–796.
103. **Sudeshna, G., and K. Parimal.** 2010. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Eur. J. Pharmacol.* **648**:6–14.
104. **Svasti, J., and B. Panijpan.** 1977. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: A simple explanation of why it works. *J. Chem. Educ.* **54**: 560-562.
105. **Takayama, K., and J. O. Kilburn.** 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1493–1499.
106. **Takede, M., K. Nishinuma, S. Yamashita, T. Matsubayashi, S. Tanino, and T. Nishimura.** 1986. Serum haloperidol levels of schizophrenics receiving treatment for tuberculosis. *Clin. Neuropharmacol.* **9**:386-397.
107. **Teh, J. S., T. Yano, and H. Rubin.** 2007. Type II NADH : Menaquinone Oxidoreductase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Desord. Drug Targets.* **7**:169–181.
108. **Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer.** 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet.* **341**:647–650.
109. **Tomioka, H.** 2008. Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure–activity relationship. *Expert Opin. Drug Discov.* **3**:21–49.
110. **Udwadia, Z. F.** 2012a. Totally drug-resistant tuberculosis in India : Who let the djinn out ? *Respirology.* **17**:741–742.
111. **Udwadia, Z. F., R. A. Amale, K. K. Ajbani, and C. Rodrigues.** 2012b. Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. *Clin. Infect. Dis.* **54**:579–581.
112. **Ulrichs, T., and S. H. Kaufmann.** 2002. Mycobacterial persistence and immunity. *Front. Biosci.* **7**:458-469.
113. **Velayati, A. A., M. R. Masjedi, P. Farnia, P. Tabarsi, J. Ghanavi, A. H. Ziazarifi, and S. E. Hoffner.** 2013. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli. *Chest.* **136**:420–425.

114. **Vilchèze, C., T. R. Weisbrod, B. Chen, L. Kremer, M. H. Hazbo, F. Wang, D. Alland, J. C. Sacchetti, and W. R. Jacobs.** 2005. Altered NADH/NAD⁺ Ratio Mediates Coresistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:708–720.
115. **Vilchèze, C., and W. R. Jacobs.** 2007. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:35-50.
116. **Viveiros, M., C. Leandro, and L. Amaral.** 2003. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:274–278.
117. **Viveiros, M., A. Jesus, M. Brito, C. Leandro, M. Martins, D. Ordway, A. M. Molnar, L. Amaral, M. Viveiros, A. Jesus, M. Brito, C. Leandro, M. Martins, D. Ordway, A. M. Molnar, J. Molnar, and L. Amaral.** 2005. Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3578-3582.
118. **Viveiros, M., M. Dupont, L. Rodrigues, I. Couto, A. Davin-Regli, M. Martins, J. M. Pagès, and L. Amaral.** 2007. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PloS One* **2**:e365.
119. **Viveiros, M., and J. Atouguia.** 2008. Tuberculose. 1^a ed. Europress, Portugal.
120. **Viveiros, M., A. Martins, L. Paixão, L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, E. Fährnich, W. V. Kern, and L. Amaral.** 2008. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**:458–462.
121. **Viveiros, M., L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, G. Spengler, A. Martins, and L. Amaral.** 2010a. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system. *Methods Mol. Biol.* **642**:159–172.
122. **Viveiros, M., M. Martins, I. Couto, D. Machado, I. Portugal, and L. Amaral.** 2010b. Molecular tools for rapid identification and novel effective therapy against MDRTB / XDRTB infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **8**:465–480.
123. **Viveiros, M., M. Martins, L. Rodrigues, D. Machado, I. Couto, J. Ainsa, and L. Amaral.** 2012. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **10**:983–998.

124. **Walzl, G., K. Ronacher, W. Hanekom, T. J. Scriba, and A. Zumla.** 2011. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **11**:343–354.
125. **Warman, A. J., T. S. Rito, N. E. Fisher, D. M. Moss, N. G. Berry, P. M. O'Neill, S. A. Ward, and G. A. Biagini.** 2012. Antitubercular pharmacodynamics of phenothiazines. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:869–880.
126. **Wayne, L. G.** 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and Latency of Disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:908–914.
127. **Weinstein, E. A., T. Yano, L. S. Li, D. Avarbock, A. Avarbock, D. Helm, A. A. McColm, K. Duncan, J. T. Lonsdale, and H. Rubin.** 2005. Inhibitors of type II NADH:menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **102**:4548–4553.
128. **Williams, K. J., and K. Duncan.** 2007. Current strategies for identifying and validating targets for new treatment-shortening drugs for TB. *Curr. Mol. Med.* **7**:297–307.
129. **Williams, K. J., G. Joyce, and B. D. Robertson.** 2010. Improved mycobacterial tetracycline inducible vectors. *Plasmid.* **64**:69–73.
130. **World Health Organization.** 2011. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva. WHO/HTM/TB/2011.6
131. **World Health Organization.** 2012. Global tuberculosis report 2012. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acedido em Maio, 2013.
132. **Yano, T., L. S. Li, E. Weinstein, J. S. Teh, and H. Rubin.** 2006. Steady-state kinetics and inhibitory action of antitubercular phenothiazines on *Mycobacterium tuberculosis* type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2). *J. Biol. Chem.* **281**:11456–11463.
133. **Yoshimuras, F., and A. F. Brodie.** 1981. Interaction of vanadate with membrane-bound ATPase from *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* **256**:12239–12242.